

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2011

Laura Auranen

PROTEIININ ISOELEKTRISEN PISTEEN MÄÄRITYSMENETELMÄN KEHITTÄMINEN



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Laura Auranen

PROTEIININ ISOELEKTRISEN PISTEEN MÄÄRITYSMENETELMÄN KEHITTÄMINEN

Opinnäytetyö tehtiin Turun yliopiston Biofysiikan laboratoriossa, biolääketieteen laitoksella. Opinnäytetyö oli osa projektia, jossa tutkimusalueena oli nanopartikkeliperusteisten epäspesifisten menetelmien kehittäminen proteiinin ominaisuuksien ja pitoisuuden määrittämiseen käyttäen aikaerotteista fluoresenssia. Työ vaatii määrittysten parametrien optimoinnin sekä määrittämis- ja kehittämis- ja kehittämistä.

Työn tarkoituksena oli kehittää sekoita ja mittaa -tyyppinen menetelmä proteiinin isoelektrisen pisteen määrittämiseen. Optimoitiin menetelmää, jossa mikrotiiterilevyllä on valmiiksi kuivattuna adsorptiopuskurin komponentit eri pH:iden saavuttamiseksi. Käyttäjä voi siten lisätä vain proteiinin, nanopartikkelit ja dissosiaatiopuskurin. Tästä määrittämis- ja kehittämis- ja kehittämistä nopeampi, edullisempi ja käyttäjäystävällisempi kuin olemassa olevat menetelmät.

Kehitetty mittausmenetelmä perustuu proteiinien erilaiseen adsorboitumiseen Eu(III)-kelaatilla leimattuihin polystyreenipartikkeleihin adsorptiopuskurin pH:sta riippuen. Proteiinien adsorboitumista mitattiin fluoresenssisignaalin avulla, joka on korkeimmillaan proteiinin isoelektrisessä pisteessä ja sitä matalammissa pH:issa.

Menetelmää optimoitaessa löydettiin mittaukselle sopivat parametrit, joiden avulla pystyttiin määrittämään proteiinin isoelektrinen piste suunnilleen puolen pH -yksikön tarkkuudella. Optimoiduiksi parametreiksi saatiin: adsorptiopuskurina universaalipuskuri eri pH:issa ja puskurikomponentit kaivoissa, proteiinipitoisuus 0,21 mg/l ja tilavuus mikrotiiterilevyn kaivossa 70 µl, Eu(III)-partikkelien pitoisuutena $1,7 \cdot 10^6$ µl tilavuudessa 5 µl, dissosiaatiopuskurina 0,50 M glysiini (pH = 0,75) tilavuudessa 10 µl sekä mittausajankohtana noin 30 minuuttia dissosiaatiopuskurin lisäyksestä.

ASIASANAT:

luminesenssi, aikaerotteinen fluorometria, proteiini, isoelektrinen piste, nanopartikkeliadsorptio

Laura Auranen

DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHOD FOR DETERMINATION OF PROTEIN ISOELECTRIC POINT

The thesis project was performed in the Laboratory of Biophysics, Institute of Biomedicine, University of Turku. The thesis was part of a project, in which nanoparticle-based non-specific methods were developed to determine the characteristics and concentration of proteins with the aid of time-resolved fluorescence. The aims of project included the optimization of the determination parameters and further study and development of the method.

The objective was to develop a mix and measure method for the determination of isoelectric points of proteins. The method was optimized as a simple microtiter plate assay, in which the adsorption buffer components are dried to the wells to achieve different pH values, and the end-user needs to add only proteins, nanoparticles and dissociation buffer. The study set out to develop a faster, cheaper and more user-friendly analytical method than the ones currently in use.

The developed method is based on the different adsorption of proteins on polystyrene particles labeled with Eu(III)chelate. The efficiency of adsorption depends on the pH of the adsorption buffer. Protein adsorption was measured in the form of a fluorescence signal which achieves its highest level at the isoelectric point of the protein and below.

In the optimization of the method, suitable parameters were found for the assay in order to determine the isoelectric point of the protein at a precision of approximately 0.5 pH units. The optimized parameters comprised universal buffer as adsorption buffer at different pH levels with buffer components in wells, a protein concentration of 0.21 mg/l and a volume of 70 µl in the microtiter plate well, a concentration of $1.7 \cdot 10^6$ /µl of Eu(III)particles and a volume of 5 µl in the well, 0.50 M glycine (pH 0.75) as the dissociation buffer and a volume of 10 µl in the well, and an incubation time of 30 minutes after the addition of the dissociation buffer.

KEYWORDS:

luminescence, time-resolved fluorometry, protein, isoelectric point, nanoparticle adsorption

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET	8
1 JOHDANTO	9
2 FLUOROMETRIA	11
2.1 Fluoresenssi ja fosforesenssi	12
2.2 Aikaerotteinen fluorometria	14
3 PROTEIINIT	15
3.1 Proteiinien rakenne	15
3.2 Proteiinien adsorptio	17
3.2.1 Entalpiavaikutukset	18
3.2.2 Entropiset vuorovaikutukset	18
3.2.3 Adsorptioon vaikuttavia muita tekijöitä	19
3.3 Proteiinien isoelektrinen piste ja proteiinin adsorptio isoelektrisessä pisteessä	20
3.3.1 Symmetrinen malli sivuttaishylkimisessä	20
3.3.2 Symmetrinen malli konformaation muutoksena	21
3.3.3 Asymmetrinen malli konformaation muutoksesta ja pintahylkimisestä	21
3.4 Zeta-potentiaali	21
4 ISOELEKTRISEN PISTEEN MÄÄRITYSMENETELMÄT	23
4.1 Isoelektrinen fokusointi	23
4.2 Teoreettinen isoelektrisen pisteen laskin	25
5 MATERIAALIT JA LAITTEET	26
5.1 Fluoresenssin mittauslaitteen toimintaperiaate	26
5.2 Käytetyt proteiinit	27
6 MENETELMÄ	29
6.1 Menetelmän periaate	29
6.2 Työn tarkoitus	33
6.3 Amino-modifioitujen polystyreenipartikkelien leimaus Eu(III)kelaatilla	33
6.4 Zeta-potentiaali-mittaus	33
6.5 Adsorptiopuskurin valmistus	34
6.6 Puskurikomponenttien kuivaus kuoppalevyille	34
6.7 pH:n muutoksen testaus	34
6.8 Proteiiniliuosten valmistus	35
6.9 Proteiinin isoelektrisen pisteen mittausmenetelmän kehitys	35

6.9.1	Proteiinilaimennosten valmistus mittauksiin	35
6.9.2	Dissosiaatiopuskurin optimointi	36
6.9.3	Glysiinin pitoisuuden optimointi	36
6.9.4	Eu-partikkeli-pitoisuuden optimointi	37
6.9.5	Proteiinipitoisuuden optimointi	37
6.10	Proteiinien isoelektrisen pisteen määrittäminen erilaisilla analysointimenetelmillä	37
6.11	Proteiinin teoreettisen pI:n laskeminen	38
7	TULOKSET JA ARVIOINTI	42
7.1	Amino-modifioitujen polystyreenipartikkelien merkintä Eu(III)-kelaatilla	42
7.2	Zeta-potentiaalimittaus	42
7.3	Universaalipuskurin pH:n muutos kuivauksen aikana	43
7.4	Dissosiaatiopuskurin optimointi	45
7.5	Glysiinin pitoisuuden optimointi	47
7.6	Eu-partikkeli-pitoisuuden optimointi	49
7.7	Proteiinipitoisuuden optimointi	49
7.8	Proteiinien isoelektrisen pisteen määrittäminen erilaisilla analysointimenetelmillä	54
7.8.1	Isoelektrisen pisteen määrittäminen fluoresenssisignaalista	54
7.8.2	Isoelektrisen pisteen määrittäminen signaali/tausta-suhteesta	59
7.8.3	Tapojen vertailu	64
7.9	Proteiinien teoreettinen pI	65
8	YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET	67
9	LÄHTEET	69

LIITTEET

Liite 1.	Proteiinilaimennosten valmistus mittauksiin 1.	72
Liite 2.	Proteiinilaimennosten valmistus mittauksiin 2.	73

KUVAT

Kuva 1.	Pharmacia PhastSystemin korkean nopeuden elektroforeesi systeemi ²³	25
Kuva 2.	Wallacin Victor monileimauslaskuri. ²⁷	27

KUVIOT

Kuvio 1. Fluoresenssin ja fosforesenssin synty. ²	11
Kuvio 2. Eräs muoto Jablonskin diagrammista.	13
Kuvio 3. Stokesin siirtymä.	13
Kuvio 4. Aikaerotteisen fluorometrian periaate.	14
Kuvio 5. Proteiinien adsorboituminen kiinteälle pinnalle. Vasemmassa kuvassa proteiinit ovat sijoittuneet pinnalle lyhyt akseli kohtisuorassa pintaa vasten ja oikeassa kuvassa pitkä akseli kohtisuorassa pintaa vasten.	19
Kuvio 6. Isoelektrisen fokusoinnin toimintaperiaate.	24
Kuvio 7. Fluoresenssisignaalin muutos pH:n suhteen.	29
Kuvio 8. Proteiinien sitoutuminen Eu-partikkeliin.	30
Kuvio 9. Fluoresenssisignaalin muodostuminen. Ylemmässä kuvassa ei saada fluoresenssia, koska Eu^{3+} -ioni on dissosioitunut ligandista ja virittyvä ligandi ei tällöin kykene siirtämään energiaa Eu^{3+} -ionille. Alemmassa kuvassa proteiinit estävät dissosioivan puskurin pääsyn kelaattien luo, jolloin dissosiaatiota ei tapahdu ja saadaan suuri fluoresenssi.	32
Kuvio 10. Leimaamattoman aminomodifioidun polystyreenipartikkelin zeta-potentiaali Smoluchowskin approksimaation mukaan universaalipuskurin pH:n funktiona.	43
Kuvio 11. Dissosiaatiopuskurin optimointi 1: fluoresenssi adsorptiopuskurin (0,50 M glysiini) pH:n funktiona. BSA:n pitoisuus kaivoissa 0,21 mg/l.	45
Kuvio 12. Dissosiaatiopuskurin optimointi 2: fluoresenssi adsorptiopuskurin (0,50 M oksaalihappo tai HCl) pH:n funktiona. BSA:n pitoisuus kaivossa 0,21 mg/l.	46
Kuvio 13. Dissosiaatiopuskurin optimointi 3: signaalien suhde (pH 4,49 / pH 6,50) dissosiaatiopuskurien pH:n funktiona. BSA:n pitoisuus kaivoissa 0,21 mg/l.	47
Kuvio 14. Glysiinin määrän optimointi: 0,50 M glysiinin (pH = 2) fluoresenssi ajan funktiona. Histonin pitoisuus kaivoissa 0,21 mg/l.	48
Kuvio 15. Mittausajankohdan optimointi: 0,50 M glysiinin (pH = 2) signaali/tausta - suhde ajan funktiona. Histonin pitoisuus kaivoissa 0,21 mg/l.	48
Kuvio 16. Eu-partikkeli-pitoisuuden optimointi: fluoresenssi adsorptiopuskurin pH:n funktiona. BSA:n pitoisuus kaivoissa 0,21 mg/l.	49
Kuvio 17. Proteiinipitoisuuden optimointi BSA:lle: fluoresenssi adsorptiopuskurin pH:n funktiona.	51
Kuvio 18. Proteiinipitoisuuden optimointi γG :lle: fluoresenssi adsorptiopuskurin pH:n funktiona.	51
Kuvio 19. Proteiinipitoisuuden optimointi histonille: fluoresenssi adsorptiopuskurin pH:n funktiona.	52
Kuvio 20. Proteiinipitoisuuden optimointi karboanhydraasille: fluoresenssi adsorptiopuskurin pH:n funktiona.	52
Kuvio 21. Proteiinipitoisuuden optimointi trypsinogeenille: fluoresenssi adsorptiopuskurin pH:n funktiona.	53
Kuvio 22. Proteiinipitoisuuden optimointi pepsiinille: fluoresenssi adsorptiopuskurin pH:n funktiona.	53
Kuvio 23. Naudan seerumin albumiinin (BSA) isoelektrisen pisteen määrittäminen fluoresenssisignaalista: fluoresenssisignaali adsorptiopuskurin pH:n funktiona.	56
Kuvio 24. Pepsiinin isoelektrisen pisteen määrittäminen fluoresenssisignaalista: fluoresenssisignaali adsorptiopuskurin pH:n funktiona.	57
Kuvio 25. Gammaglobuliinin isoelektrisen pisteen määrittäminen fluoresenssisignaalista: fluoresenssisignaali adsorptiopuskurin pH:n funktiona.	57
Kuvio 26. Karboanhydraasin isoelektrisen pisteen määrittäminen fluoresenssisignaalista: fluoresenssisignaali adsorptiopuskurin pH:n funktiona.	58

Kuvio 27. Trypsinogeenin isoelektrisen pisteen määrittäminen fluoresenssisignaalista: fluoresenssisignaali adsorptiopuskurin pH:n funktiona.	58
Kuvio 28. Histonin isoelektrisen pisteen määrittäminen fluoresenssisignaalista: fluoresenssisignaali adsorptiopuskurin pH:n funktiona.	59
Kuvio 29. BSA:n isoelektrisen pisteen määrittäminen signaali/tausta-suhteesta: signaali/tausta-suhde adsorptiopuskurin pH:n funktiona.	61
Kuvio 30. Pepsiinin isoelektrisen pisteen määrittäminen signaali/tausta-suhteesta: signaali/tausta-suhde adsorptiopuskurin pH:n funktiona.	61
Kuvio 31. Gammaglobuliinin isoelektrisen pisteen määrittäminen signaali/tausta-suhteesta: signaali/tausta-suhde adsorptiopuskurin pH:n funktiona.	62
Kuvio 32. Karboanhydraasin isoelektrisen pisteen määrittäminen signaali/tausta-suhteesta: signaali/tausta-suhde adsorptiopuskurin pH:n funktiona.	62
Kuvio 33. Trypsinogeenin isoelektrisen pisteen määrittäminen signaali/tausta-suhteesta: signaali/tausta-suhde adsorptiopuskurin pH:n funktiona.	63
Kuvio 34. Histonin isoelektrisen pisteen määrittäminen signaali/tausta-suhteesta: signaali/tausta-suhde adsorptiopuskurin pH:n funktiona.	63
Kuvio 35. Proteiini-laimennosten 700 mg/l valmistus.	72
Kuvio 36. Loppujen proteiinipitoisuuksien valmistus mittauksiin.	73

TAULUKOT

Taulukko 1. Käytettyjen proteiinien molekyylipainot ja isoelektriset pisteet kirjallisuuslähteiden mukaan.	28
Taulukko 2. Proteiinien aminohapposekvenssit.	39
Taulukko 3. Proteiinien aminohapposekvenssit (jatkuu).	40
Taulukko 4. Universaalipuskurin pH:n muutos kuivauksen aikana.	44
Taulukko 5. Proteiinien isoelektriset pisteet tulkittuna suoraan fluoresenssisignaalista.	55
Taulukko 6. Proteiinien isoelektriset pisteet tulkittuna signaali/tausta –suhteesta.	60
Taulukko 7. Eri menetelmin tulkittujen proteiinien isoelektrisen pisteen vertailu kirjallisuus arvoihin.	65
Taulukko 8. Proteiineille teoreettisesti lasketut pI:t.	66
Taulukko 9: Kirjallisen-, teoreettisen laskimen- ja määritetyn proteiinin isoelektrisen pisteen vertailu.	67

KÄYTETYT LYHENTEET

BSA	bovine serum albumin; naudan seerumin albumiini
DELFI	dissociation-enhanced lanthanide fluorescent immunoassay; dissosiaatiotehostettu lantanidin fluorometrinen immunomääritys
γ G	gammaglobuliini
pI	isoelektrinen piste

1 JOHDANTO

Tämä opinnäytetyö tehtiin Turun yliopiston Biofysiikan laboratoriossa biolääketieteen laitoksella. Opinnäytetyö oli osana projektia, jossa tutkimusalueena oli nanopartikkeliperusteisten epäspesifisten menetelmien kehittäminen proteiinin ominaisuuksien ja pitoisuuden määrittämiseen käyttäen aikaerotteista fluoresenssia. Projektin tehtäviin kuului määrittysten parametrien optimointi sekä määrittäksen tutkiminen ja kehittäminen. Työn tarkoituksena oli kehittää ”sekoita ja mittaa -tyyppinen” menetelmä proteiinin isoelektrisen pisteen määrittämiseen.

Tällä hetkellä proteiinin isoelektristä pistettä voidaan määrittää kokeellisella isoelektrisellä fokuksinnalla ja teoreettisella aminohapposekvenssiin perustuvalla isoelektrisen pisteen laskimella. Isoelektrinen fokuksointi vaatii kalliin laitteen ja reagenssit, tarkkaan määritetyn standardin, vaarallisia aineita ja mahdollisesti myös geelin tulkinta/kuvauslaitteen. Teoreettinen aminohapposekvenssiin perustuva isoelektrisen pisteen laskin taas vaatii jo etukäteen paljon tietoa proteiinista, kuten aminohapposekvenssin. Uudesta menetelmästä pyritään kehittämään aiempia menetelmiä käyttäjäystävällisempi, edullisempi ja nopeampi.

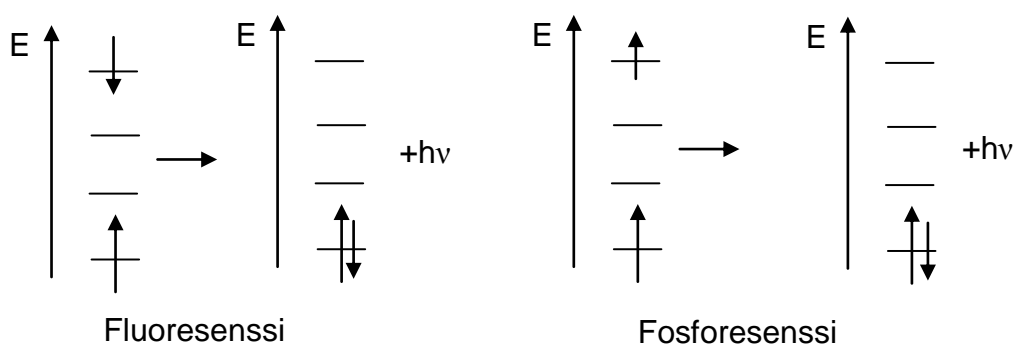
Opinnäytetyössä optimoitiin menetelmää, joka perustuu proteiinin erilaiseen adsorboitumiseen Eu(III) -kelaatilla leimattuun nanopartikkeliin eri pH:issa. Proteiinit ovat yleensä positiivisesti varautuneita suhteessa negatiivisesti varautuneeseen partikkeliin ja sitoutuvat partikkeliin hyvin proteiinin isoelektrisen pisteen lähettävillä ja sen alapuolella, mutta sitoutuminen laskee ja tasaantuu isoelektristä pistettä korkeammassa pH:ssa johtuen negatiivisen partikkelin ja negatiivisen proteiinin hylkimisestä. Tämä näkyy aikaerotteisen fluorometrian signaalissa.

Tämän työn tarkoituksena oli kehittää menetelmä, jossa mikrotiitterilevyllä on valmiina kuivattuna adsorptiopuskurin puskurikomponentit eri pH:iden saavuttamiseksi ja käyttäjä lisäisi vain proteiinin, nanopartikkelit sekä

dissosiaatiopuskurin ja saisi mittauksessa selville tuntemattomankin proteiinin isoelektrisen pisteen.

2 FLUOROMETRIA

Luminesenssilla tarkoitetaan molekyylien lähettämää valoa elektronisesti virittyneissä tiloissa. Molekyyli absorboi valoa, jolloin molekyylin elektroni siirtyy sen perustilalta viritystilalle, eli tapahtuu eksitaatio. Kun elektroni siirtyy alemmalle elektronitilalle, molekyyli säteilee fotoneita eli emittoi valoa. Tämä molekyylien lähettämä valo voidaan jakaa kahteen kategoriaan, fluoresenssiin ja fosforesenssiin riippuen niiden virittymistilan luonteesta. Näiden syntymekanismit poikkeavat toisistaan elektronin spin-tilan eli elektronin magneettisen momentin muutoksen suhteen (kuvio 1). Nämä säteilylajit voidaan erottaa toisistaan, jos niiden elinikä voidaan mitata, sillä fluoresenssi on nopeampi prosessi kuin fosforesenssi. Fluoresenssispektri sijaitsee yleisesti myös lyhyemmällä aallonpituudella kuin fosforesenssispektri.^{1,2}



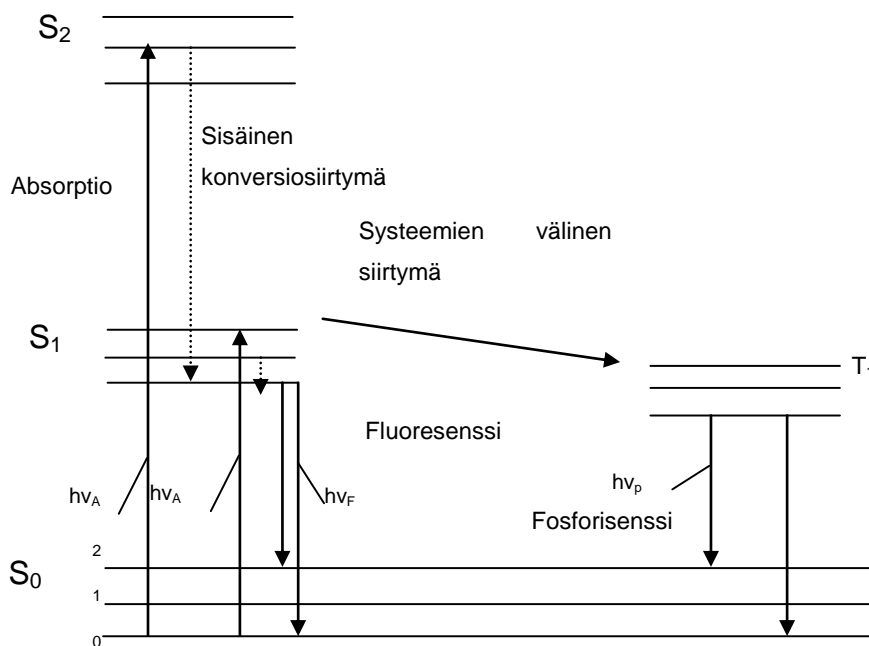
Kuvio 1. Fluoresenssin ja fosforesenssin synty.²

2.1 Fluoresenssi ja fosforesenssi

Virityksen purkautumista kahden singlettitilan välillä kutsutaan fluoresenssiksi. Singlettitilassa virittyneen tilan orbitaalilla olevan elektronin spin on vastakkaissuuntainen perustilan ylimmälle orbitaalille jääneen elektronin suhteen. Virittyneen elektronin paluu perustilaan tapahtuu nopeasti (10^8 s^{-1}) ja samalla matalaenergisiin fotoni emittoituu. Fluoresenssin elinikä on lähes 10 ns. Fosforesenssissa emissio tapahtuu triplettitilalta, jossa virittyneellä energiatilalla olevan elektronin spin on samansuuntainen perustilaan jääneen elektronin kanssa. Kuviossa 1 on esitetty singlettitilan ja triplettitilan ero. Toisin kuin fluoresenssissa, fosforesenssissa siirtyminen perustilaan ei ole mahdollista, ja tästä johtuu emission hitaus ($10^3 - 10^0 \text{ s}^{-1}$) sekä fosforesenssin pitkä elinikä (1 ms-1 s).¹

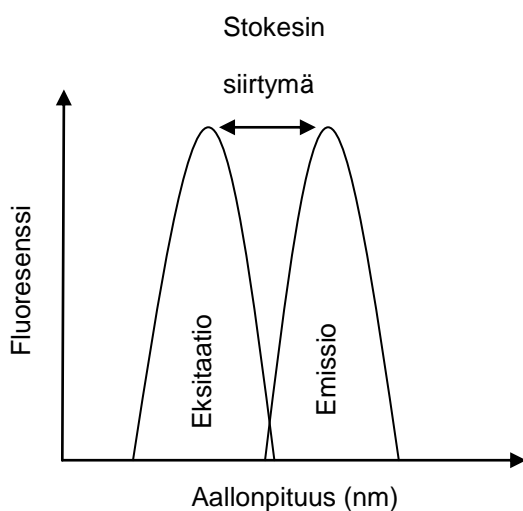
Fluoresenssi esitetään yleensä emissiospektrinä, jonka kuvaajassa on esitetty fluoresenssin voimakkuus aallonpituuden tai aallontiheyden funktiona. Emissionpektri on riippuvainen luminoivan yhdisteen rakenteesta ja liuottimesta, johon se on liuotettu. Näyteliuoksessa olevalla hapella on suurempi sammuttava vaikutus fosforesenssin emissioon kuin fluoresenssiin. Liuoksessa tapahtuvat valokemialliset ja -fysikaaliset prosessit vaikuttavat voimakkaasti emissioilmiöihin. Fluoresenssin tärkein ominaisuus on hyvä detektioherkkyys.^{1,2}

Prosessit, jotka tapahtuvat valon absorption ja emission välillä kuvataan usein Jablonskin diagrammilla. Jablonskin energiatasodiagrammi on esitetty kuviossa 2. Singlettiperustila on kuvattu S_0 :na ja S_1 ja S_2 ovat virittyneitä singlettitiloja. T_1 kuvastaa virittynyttä triplettitilaa. Luminoivien yhdisteiden elektronien energiatasot on merkitty kuvaan 0, 1, 2, jne. Pystysuorat viivat kuvaavat elektronien siirtymiä tilojen välillä. Absorptio tapahtuu tyypillisesti molekyyleille, joilla on alin virittymiseen vaadittava energia.¹



Kuvio 2. Eräs muoto Jablonskin diagrammista.

Jablonskin diagrammista nähdään, että absorptiolla on suurempi energia kuin emissiolla. Eli fluoresoivilla molekyyileillä tapahtuu energiahäviö eksitaation ja emission välillä. Tätä eroa kutsutaan Stokesin siirtymäksi (kuvio 3).¹

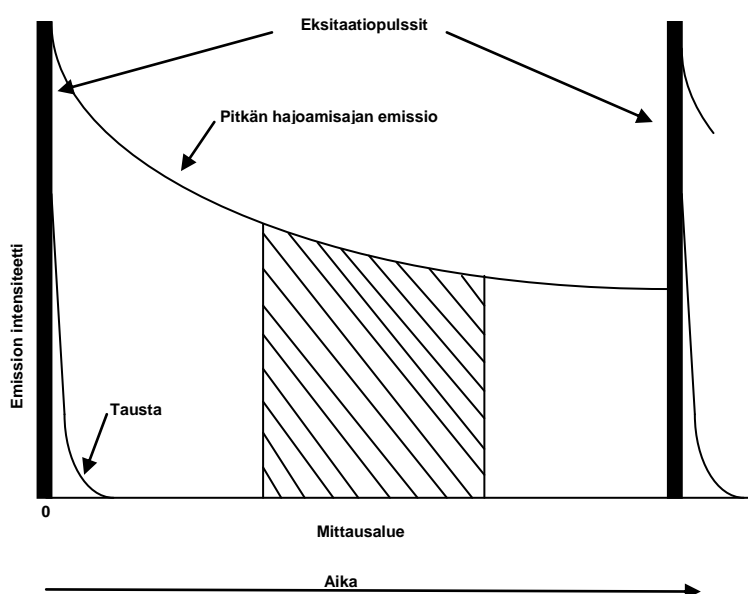


Kuvio 3. Stokesin siirtymä.

2.2 Aikaerotteinen fluorometria

Aikaerotteisessa fluorometriassa seurataan valolle altistetun näytteen emissiota eli mitataan fluoresenssia ajan funktiona eksitaation jälkeen. Aikaerotteisella fluoresenssilla saadaan poistettua taustasäteilyn vaikutus lantanidien avulla, jolloin saavutetaan suuri herkkyys ja laaja mittausalue. Taustasäteily johtuu biologisista aineista näytteessä, kuten proteiineista ja DNA:sta. Aikaerotteisessa fluoresenssissa pitkä lantanidien elinikä mahdollistaa mittauksen aikaviiveen jälkeen, jolloin taustasäteily on loppunut ja pitkän fluoresenssin aineet jatkavat emissiota (kuvio 4). Aikaerotteisessa fluorometriassa signaali/tausta-suhde kasvaa, koska sillä saavutetaan suuri Stokesin siirtymä ja kapea emissiopiikki.¹

Pitkän fluoresenssin eliniän omaavia aineita ovat lantanidimetallit, kuten terbium, europium, samarium ja dysprosium, joiden fluoresenssin elinikä on tyypillisesti 0,5 – 3 ms. Näillä lantanidimetalleilla on kuitenkin heikko absorptio, jota vahvistetaan kelatoimalla ne orgaanisilla ligandeilla, jotka siirtävät eksitaatioenergiansa lantanidi-ioneille. Orgaanisissa ligandeissa on valoa keräävä rengasrakenne, aktiivinen ryhmä, joka kykenee sitoutumaan kovalenttisesti proteiineihin, sekä metallin kelatoivat hampaat, joilla tarkoitetaan koordinaatiosidoksia europiumionin ja ligandin vapaiden elektroniparien välillä.^{1,3,4}



Kuvio 4. Aikaerotteisen fluorometrian periaate.

3 PROTEIINIT

Tässä kappaleessa käsitellään proteiineja, niiden rakennetta ja adsorptiota kiinteään pintaan. Proteiinien isoelektrisellä pisteellä on vaikutusta proteiinien adsorptioon, sillä proteiinin pI :tä matalammissa pH :issa ja pI :n lähetyvillä adsorptio on voimakasta, mutta proteiinin pI :n jälkeen adsorptio laskee tasaisen matalalle. Tätä korkeampaa adsorboitumista proteiinin pI :n lähetyvillä on perusteltu kolmella erilaisella mallilla. Zeta-potentiaali kertoo varauksesta, joka syntyy kiinteän pinnan ja nesteen rajapinnalle. Proteiinin isoelektrisessä pisteessä vuorovaikutus kiinteän pinnan ja proteiinin välillä ei niinkään perustu ionisiin vuorovaikutuksiin, vaan proteiinin hydrofobisiin ominaisuuksiin. Proteiinien liukoisuus veteen on minimissään niiden pI :ssä, jolloin ne hakeutuvat partikkelien lähetyville minimoidakseen kosketuksensa veteen. Zeta-potentiaalilla ei siis ole kovin suurta vaikutusta adsorptioon proteiinin pI :ssä, vaikka muissa pH :issa partikkelin varaus vaikuttaa suuresti. Proteiinien adsorptio kuitenkin muuttaa zeta-potentiaalia siirtämällä nesteen ja kiinteän pinnan rajapintaa kauemmas kiinteästä pinnasta.

3.1 Proteiinien rakenne

Proteiini on aminohappojen ja peptidisidoksien muodostama ketju, polypeptidi. Jokaisella proteiinilla on sivuketjuja, jotka saavat aikaan proteiinien erilaiset rakenteet ja biologisen toiminnan. Nämä sivuketjut voidaan luokitella emäksisiin, happamiin, polaarisiin varauksettomiin, polaarittomiin ja hydrofobisiin. Proteiinien liukoisuutta alentavat ja hydrofobisuutta kasvattavat aminohapot ovat aromaattisia ja alifaattisia. Proteiinien tarttumisen negatiivisesti varauksellisiin ryhmiin mahdollistavat emäksisten aminohappojen positiivisesti varaukselliset ryhmät. Happamat, negatiivisesti varaukselliset aminohappojen ryhmät mahdollistavat proteiinien tarttumisen positiivisesti varauksellisiin ryhmiin. Proteiinin pysyvyyttä lisää rikkisidosten muodostuminen molekyylien sisällä ja niiden välillä.⁵

Peptidisidos muodostuu ensimmäisen aminohapon karboksyyli-ryhmän ja toisen aminohapon aminoryhmän välille. Peptidisidos on tasomainen ja jäykkä sen osittaisen kaksoissidosluonteensa vuoksi. Kuitenkin peptidisidoksen molemmiin puolin olevat typpi-hiili- ja hiili-hiilidisidokset voivat kiertyä akselinsa ympäri. Tämä mahdollistaa sivuryhmien hakeutumisen steerisesti ja energeettisesti niille edullisimpaan muotoon. Tämä taas mahdollistaa proteiinin kolmiulotteisen muodon, joka useimmiten on pallomainen eli globulaarinen, mutta on olemassa myös säikeisiä proteiineja.⁵

Proteiinien kolmiulotteinen rakenne, konformaatio, johtuu hiiliketjun taipuilusta, jonka aiheuttaa aminohappojärjestys ja niiden määrä proteiinissa.⁵ Primäärirakenteella tarkoitetaan aminohappojen sekvenssiä ja lukumäärää yhdessä disulfidisidosten määrän ja sijainnin kanssa. Sekundäärirakenne on paikallisten poimuuntumisalueiden esiintymistä proteiineissa, kuten α -kierre tai β -käännös. Tertiäärirakenne on polypeptidiketjun kolmiulotteinen rakenne ja kvaternäärirakenne on erilaisten polypeptidiketjujen fuusioituminen yhteen rakenneyksikköön.⁶

Proteiinien spesifiset sitoutumisominaisuudet, toisen proteiinin tai molekyylin kanssa, määräytyy proteiinin konformaation mukaan. Proteiinien liukoisuus veteen vaihtelee eri proteiinien kohdalla paljon ja tähän vaikuttaa aminohappokoostumuksen lisäksi proteiinin glykolysaatio eli proteiiniin kovalenttisesti kiinnittyneet sokeriryhmät. Sokeriosat ovat hydrofiilisiä ja lisäävät lisäksi proteiinin stabiiliutta. Happamat ja emäksiset ryhmät määräävät proteiinin kokonaisvarauksen ja ryhmien varaukset muuttuvat pH:n muuttuessa. Heikon hapon tai emäksen varaus on positiivinen pK_a -arvon alapuolella ja vastaavasti negatiivinen sen yläpuolella. Eli pH:n noustessa positiivisten varausten määrä vähenee ja negatiivisten lisääntyy, pH:n laskiessa taas päinvastoin.⁵

3.2 Proteiinien adsorptio

Proteiinien adsorptioprosessi kiinteä-neste rajapintaan voidaan jakaa vähintään neljään seuraavaan vaiheeseen:

1. Proteiinin siirtyminen rajapinnalle
2. Adsorptioprosessi
3. Uudelleenjärjestäytyminen ja/tai konformaation muutos
4. Desorptio tai vaihto

Proteiinin siirtyminen kiinteä/neste -rajapinnalle voi tapahtua kahdella erilaisella tavalla. Ensimmäisessä tavassa proteiinien keskittymät lähellä pintaa ovat samanlaisia kuin ympäröivässä liuoksessa. Kun proteiinit alkavat adsorboitumaan, lähinnä pintaa olevat proteiinit alkavat siirtyä ja uusia proteiineja siirtyy tyhjentyneille alueille. Tässä tapauksessa siirtyminen on ainoastaan diffuusiota. Toinen tapa on yhdistelmä konvektiivista (eteenpäin kuljettavaa) virtausta ja diffuusiota. Tässä tapauksessa nopeus, jolla proteiinit siirtyvät pintaan on ainoastaan riippuvainen liuoksen proteiinipitoisuudesta ja proteiinin diffuusiteetistä.⁶

Proteiinien adsorptio kiinteisiin pintoihin on monimutkainen tapahtuma, johon voi vaikuttaa monet tekijät. Adsorptiota voi tapahtua erilaisille pinnoille: hydrofiilisille, hydrofobisille, neutraaleille tai varauksellisille. Pinnan ominaisuuksien lisäksi proteiinin adsorboitumiseen vaikuttaa myös proteiinin konsentraatio, liuoksen pH ja ionivahvuus sekä proteiinin ominaisuudet. Vuorovaikutus proteiinin ja pinnan välillä on vahva johtuen proteiinin polymeerisestä rakenteesta. Adsorptioprosessiin vaikuttavat sekä entalpiset että entropiset vuorovaikutukset. Entalpiassa muutokset ovat verrattavissa molekyylien välisiin voimiin, kun taas entropiassa molekyylien järjestäytymiseen. Yleisimmät adsorptioon vaikuttavat tekijät ovat proteiinin nettovaraus, proteiinin stabiilisuus ja pinnan hydrofobisuus. Entropisista vaikutuksista adsorptio hydrofobisiin pintoihin on yleisin, sillä entropia kasvaa adsorptiossa johtuen vähentyneestä kontaktista veteen.^{7,9,15}

3.2.1 Entalpiavaikutukset

Proteiinien amino- ja karboksylaattiryhmien ansiosta proteiinien sekä proteiinien ja pintojen välillä tapahtuu ionista vuorovaikutusta. Nämä amino- ja karboksylaattiryhmät muodostavat proteiineihin sekä positiivisesti että negatiivisesti varautuneita alueita. Proteiinien kokonaisvaraus muodostuu näiden alueiden summasta. Varauksellisten proteiinien välillä vaikuttavia voimakkaita, pitkän kantaman voimia kutsutaan Couloumbin voimiksi. Nämä elektrostaattiset vuorovaikutukset vaikuttavat proteiinin stabiilisuuteen. Kiinteillä pinoilla ja proteiineilla on usein sähkövarauksia, joiden välille voi syntyä Couloumbin voimia. Varaukseen vaikuttaa pH, suola ja ionivahvuus ympäröivässä liuoksessa. Heikoimpia molekyylien välisiä voimia kutsutaan Van der Waalsin voimiksi, jotka syntyvät äkillisistä muutoksista molekyyliissä, jotka taas aiheutuvat elektronien liikkeestä atomien ympärillä. Proteiinin pinnan ympärillä vaikuttaa ionipilvi, joka heikentää proteiinien vuorovaikutuksia. Van der Waalsin voima perustuu hetkelliseen elektrostaattiseen vuorovaikutukseen molekyylien välillä. Nämä voimat vaikuttavat vain lyhyellä kantamalla, mutta myötävaikuttavat silti proteiinin ja kiinteän pinnan vuorovaikutukseen.^{7,8,10,11}

3.2.2 Entropiset vuorovaikutukset

Hydrofobiset vuorovaikutukset ovat tärkeimpiä voimia proteiinien vuorovaikutuksissa. Tässä vuorovaikutuksessa proteiini ja kiinteä pinta muodostaa yhteisen, erillisen kiinteän faasin vedessä. Tämä johtuu siitä, että vesimolekyyleillä on suurempi sitoutumiskyky toistensa kuin hydrofobisten proteiinien kanssa. Eli proteiinien hydrofobiset osat syrjäytyvät vesiliuoksessa ja hakeutuvat kiinteän pinnan läheisyyteen. Proteiinit muokkaavat rakennettaan niin, että niiden hydrofobiset sisäosat pääsevät kosketuksiin hydrofobisen tai varautuneen pinnan kanssa. Proteiinin rakenteen muutos on sitä suurempi, mitä epästabiilimpi proteiini on. Konformaation muutoksella saadaan aikaan voimakkain vuorovaikutus proteiinin ja hydrofobisen pinnan välillä proteiinin ulkoisten, hydrofiilisten aminohappojen suojatessa pintaan kiinnittyviä proteiinin sisäisiä, hydrofobisia alueita.^{6-8,10-14}

3.2.3 Adsorptioon vaikuttavia muita tekijöitä

Proteiineja voidaan jaotella niiden rakenteellisen stabiilisuuden perusteella, sillä osa proteiineista on stabiileja, kun taas osa vähemmän stabiileita. Stabiilit proteiinit eivät muuta konformaatiotaan kovinkaan helposti, jolloin niiden vuorovaikutukset perustuvat enemmän ionisiin vuorovaikutuksiin, kuin hydrofobisiin vuorovaikutuksiin. Vähemmän stabiilit proteiinit muuttavat rakennettaan helpommin ja hydrofobinen sitoutuminen kiinteään pintaan on näille proteiineille helpompaa. Tällaisia proteiineja on mm. BSA ja γ G. Pienemmät proteiinit ovat usein stabiilimpia kuin suuret proteiinit.^{7,8,16}

Proteiinin ja pinnan ollessa varattuja vaikuttaa ionivahvuus adsorboituneen proteiinin määrään. Ionit muodostavat molekyylin ympärille ionipilven, jotka heikentävät ionisia vuorovaikutuksia proteiinin ja kiinteän pinnan välillä. Vastaionit ovat yhdistyneenä adsorboituneeseen proteiinkerrokseen liuoksessa, vaikka proteiinin nettovaraus olisikin neutraali, sillä se vähentää hylkimistä proteiinin osien ja pinnan välillä.^{7,8,17}

Aina se, että proteiineja on adsorboitunut massaltaan paljon pinnalle, ei tarkoita, että niiden välillä olisi voimakas vetovoima. Proteiinien adsorption määrä voi alentua proteiinien levittäytyessä pinnalle. Proteiinit voivat adsorboitua pinnalle pitkä akseli tai lyhyt akseli kohtisuorassa pintaa vasten (kuvio 5). Kun pitkä akseli on kohtisuorassa pintaa vasten, suurempi määrä proteiineja sopii pinnalle, kun taas, jos lyhyt akseli on kohtisuorassa pintaa vasten, mahtuu proteiineja vähemmän. Proteiinikonsentraatiolla on myös vaikutusta proteiinin asettumiseen pinnalle.^{7,8,16}



Kuvio 5. Proteiinien adsorboituminen kiinteälle pinnalle. Vasemmassa kuvassa proteiinit ovat sijoittuneet pinnalle lyhyt akseli kohtisuorassa pintaa vasten ja oikeassa kuvassa pitkä akseli kohtisuorassa pintaa vasten.

3.3 Proteiinien isoelektrinen piste ja proteiinin adsorptio isoelektrisessä pisteessä

Jokaisella proteiinilla on sille ominainen pH, jossa positiivisten ja negatiivisten varausten määrä on sama, eli nettovaraus on 0. Tämä pH on proteiinin isoelektrinen piste, pI . Proteiinilla on aina negatiivisia ja positiivisia varauksia, mutta ne ovat jakautuneet epätasaisesti pitkin proteiinin pintaa (happamat ja emäksiset ryhmät) ja niiden määrät ovat yhtä suuret pI :ssä. Happamilla proteiineilla $pI < 7$ ja emäksisillä proteiineilla vastaavasti $pI > 7$. Proteiinien liukoisuus on minimissään pI :ssä ja sen lähetyvillä ja monet proteiinit saostuvat pI :ssä. Proteiinien adsorboituminen kiinteään pintaan eli kiinteä partikkelin pinta täyttyy parhaiten proteiinien pI -arvon lähellä ja sen alapuolella johtuen proteiinien positiivisesta nettovarauksesta suhteessa voimakkaasti negatiiviseen partikkelin pintaan. Proteiinien pI :ssä hydrofobisilla vuorovaikutuksilla on myös suuri rooli. Seuraavaksi on esitetty kolme mallia pH:n vaikutuksesta adsorboitumiseen.⁵

3.3.1 Symmetrinen malli sivuttaishylkimisessä

Symmetrinen sanaa on käytetty sekä tässä että seuraavassa mallissa, koska samantyyppinen mekanismi aiheuttaa vähentynyttä adsorptiota pI :n ylä- ja alapuolella. Tässä mallissa adsorboituvien proteiinien vähäisyys johtuu sivuttaiselektrostaattisesta hylkimisestä proteiinien välillä. pI :ssä elektrostaattiset vuorovaikutukset adsorboituneiden proteiinien välillä on hyvin vähäisiä, jolloin pinnalle muodostuu tiivis kerros proteiinia. Alle pI :n proteiinit kantavat positiivista varausta ja yli pI :n negatiivista varausta, ja näistä varauksista johtuen proteiinit hylkivät toisiaan pinnalla, joka taas johtaa siihen, että proteiinien tiheys pinnalla vähenee pI :n ylä- ja alapuolella. Tässä mallissa proteiinien välinen vuorovaikutus on paljon tärkeämmässä roolissa kuin proteiinin ja pinnan välinen vuorovaikutus adsorboituvan proteiinin määrän suhteen ja muutokset proteiinin konformaatiossa pinnalla ovat erittäin rajallisia.⁷

3.3.2 Symmetrinen malli konformaation muutoksena

Tässäkin mallissa proteiinin varauksella on vaikutusta proteiinin adsorboitumiseen, mutta vähentyvä adsorboituneiden proteiinien tiheys pinnalla johtuu rakenteellisen vakauden vähenemisestä. Kun proteiinin pH ei ole sen pI :ssä, sen sähkövaraus (positiivinen/negatiivinen) vähentää sen rakenteellista pysyvyyttä. Kun pH ei ole proteiinin pI :ssä, proteiinit denaturoituvat helpommin pinnan vaikutuksesta. Nämä rakenteelliset muutokset tekevät sen, että yksi proteiini vie enemmän pinta-alaa ja tästä johtuen pienempi määrä proteiinia mahtuu adsorboitumaan pinnalle.⁷

3.3.3 Asymmetrinen malli konformaation muutoksesta ja pintahylkimisestä

Tässä mallissa proteiinin ja pinnan vuorovaikutuksella on tärkein rooli. Negatiivisesti varautuneella pinnalla positiivisesti varautunut proteiini pI :n alapuolella purkautuu pinnan vahvan elektrostaattisen varauksen vuoksi ja pI :n yläpuolella elektrostaattinen hylkiminen negatiivisesti varautuneen proteiinin ja negatiivisesti varautuneen pinnan välillä estää adsorboitumisen. pH-arvojen ollessa yli pI :n, hylkiminen vahvistuu pH:n kasvaessa. Myös pH:lla alle pI :n adsorboituvien proteiinien määrä laskee. Tämä johtuu pinnan proteiinin progressiivisesta purkautumisesta pH:n laskiessa eli proteiinit purkautuvat sitä enemmän, mitä alemmas pH laskee. Tähänkin kuitenkin vaikuttavat proteiinin stabiilisuus ja koko sekä tyyppi. Tästä johtuen vähempi määrä proteiinia peittää saman pinta-alan.⁷

3.4 Zeta-potentiaali

Zeta-potentiaali on fysikaalinen ominaisuus, joka voidaan mitata mille tahansa partikkelille suspensiossa, kuten $Eu(III)$ kelaatilla leimatulle amino-modifioidulle polystyreenipartikkelille vedessä tai universaalipuskurissa. Tämä kertoo partikkelin varauksesta, joka vaikuttaa proteiinin adsorboitumiseen sen pinnalle. Siitä voi olla apua myös ennustettaessa pitkän aikavälin stabiiliutta.¹⁹

Zeta-potentiaali on varaus, joka kehittyy kiinteän pinnan ja liuoksen rajapinnalle. Potentiaali mitataan millivolteina ja se voi syntyä useilla eri mekanismeilla. Näitä voivat olla ionisen ryhmän dissosiaatio partikkelin pinnalla ja ionien adsorptio pinnalle. Nettovaraus partikkelin pinnalla vaikuttaa ionien jakaantumiseen partikkelin lähistöllä ja nostaa vastakkaismerkkisten ionien konsentraatiota pinnan lähellä. Sähköinen kaksoiskerros muodostuu partikkelin ja nesteen rajapinnan alueelle. Sähköinen kaksoiskerros sisältää kaksi osaa: sisemmän alueen, johon sisältyy tiiviisti pintaan porrastetusti sidotut ionit ja ulomman alueen, missä elektrostaattisen voiman ja tuntemattoman lämpöliikkeen tasapaino määrittää ionien jakaantumisen. Potentiaali tällä alueella hajoaa kasvavalla etäisyydellä pinnasta kunnes riittävällä etäisyydellä se saavuttaa ympäröivän liuoksen arvon, joka on tavallisesti nolla. Sähkökentässä, kuten mikroeletroforeesissa, jokainen partikkeli ja sen lähellä olevat ionit liikkuvat liuoksen läpi ja potentiaali rajapinnan ja ympäröivän liuoksen välillä tunnetaan zeta-potentiaalina. Kun kerros makromolekyylejä on adsorboitunut partikkelin pintaan, ne siirtävät rajapintaa kauemmas pinnasta ja muuttavat zeta-potentiaalia. Zeta-potentiaalilla on tästä johtuen vaikutus partikkelin pintavaraukseen, minkä tahansa adsorptiokerroksen rajapintaan tai laatuun ja rakenteeseen ympäröivässä liuoksessa. Adsorboituvat proteiinit siis muuttavat nanopartikkelien zeta-potentiaalia siirtämällä nesteen ja partikkelin rajapintaa kauemmas partikkelin pinnasta. Zeta-potentiaali on adsorptiotilanteissa proteiinien ja nesteen rajapinnan välinen varaus ja ”partikkelin” pintavaraus nyt proteiinien varaus, joka on vastakkaismerkkinen partikkelin alkuperäiseen varaukseen nähden. Zeta-potentiaali on osoittautunut erittäin tärkeäksi tutkittaessa kolloidien, kuten partikkelien ja proteiinien stabiilisuutta ja flokkulaatioprosesseja.²⁰

4 ISOELEKTRISEN PISTEEN MÄÄRITYSMENETELMÄT

Proteiinikemiassa ja proteiinin puhdistuksessa proteiinin varauksella ja pI :llä on suuri merkitys. Tietoa proteiinin pI :stä voidaan käyttää hyödyksi mm. suunniteltaessa proteiinin puhdistusmenetelmää, kuten pohdittaessa sopivaa pH :ta ioninvaihtokromatograafiseen menetelmään.⁵ Nykyisiä menetelmiä proteiinin pI :n määrittämiseen on isoelektrinen fokusointi ja teoreettinen isoelektrisen pisteen laskin.

4.1 Isoelektrinen fokusointi

Isoelektrisessä fokusoinnissa proteiinit erotellaan niiden pI :n mukaisesti. Isoelektrinen fokusointi on geelielektroforeettinen menetelmä, jonka geelissä on paljon eri pI :n omaavia amfolyyttejä, joilla on sekä happamia että emäksisiä ryhmiä ja hyvä puskurikapasiteetti. Ajon alussa kaikkialla geelissä on sama pH . Ajossa geeliin muodostetaan pH -gradientti liosten avulla sähkökentässä. Amfolyyttien hyvän puskurikapasiteetin vuoksi pH -gradientin muodostus on mahdollista; katodipäässä on korkeampi ja anodipäässä matalampi pH . Nettovaraukseltaan negatiiviset amfolyytit kulkeutuvat kohti anodia, ja positiivisesti varautuneet kohti katodia. Amfolyytit pysähtyvät geelillä omaa pI :tään vastaavaan pH :on. Proteiininäytteet lisätään geelille. Proteiinien joutuessa sähkökentän gradienttiin, ne liikkuvat varaustensa mukaisesti joko anodia tai katodia kohti. Proteiinit liikkuvat kohti omaa isoelektristä pistettä ja pysähtyvät siihen. Proteiinien liikkumista geelillä ja pysähtymistä oman pI :nsä kohdalla on esitetty kuviossa 6. Proteiinitkin ovat siis "amfolyyttejä", mutta kulkeutuvat hitaammin suurikokoisuutensa vuoksi.^{6,21}

ohjelmisto kykenee hoitamaan geelin esiajon, sähköisen kuormituksen ja ajon automaattisesti. Kontrolloidut parametrit ovat: lämpötila, jännite, virta, teho ja voltitunti.²²



Kuva 1. Pharmacia PhastSystemin korkean nopeuden elektroforeesi systeemi²³

4.2 Teoreettinen isoelektrisen pisteen laskin

ExPASy Proteomics Server²⁴ on internet-sivusto, jolla voi laskea proteiinin teoreettisen pI :n sekä lisäksi mm. aminohappojen lukumäärän ja molekyylipainon. Teoreettisen pI :n selvittämiseen ExPASy Proteomics Server vaatii kuitenkin proteiinin sekvenssin, jonka taas voi löytää NCBI:n²⁵ datapankista. Tuntemattoman proteiinin rakenteen pI :n voi selvittää etsimällä ensin proteiinin aminohapposekvenssin NCBI:n datapankista. Tämä tapahtuu niin, että Search Protein -kenttään syötetään halutun proteiinin nimi. Ohjelma löytää valtavasti erilaisia proteiineja pelkällä nimellä, joten hakua voi tarkentaa lisäämällä myös tiedon, mistä proteiini on peräisin. Proteiineista valitaan sopiva, esimerkiksi aminohappojen lukumäärän perusteella ja kopioidaan sekvenssi. Tämä sekvenssi otetaan talteen ja lisätään se ExPASy Proteomics Serverin sivulla tälle tarkoitettuun tyhjiin kenttään. Palvelu laskee proteiinin pI :n sen aminohapposekvenssin perusteella.

5 MATERIAALIT JA LAITTEET

Tässä opinnäytetyössä kokeellisessa osassa käytettiin Wallacin Victor monileimalaskijaa (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Turku, Suomi), jolla mitattiin aikaerotteista fluoresenssia proteiininäytteistä. Laitteen toimintaperiaate on esitetty seuraavaksi. Proteiininäytteissä käytetyt proteiinit on esitelty myös tässä kappaleessa.

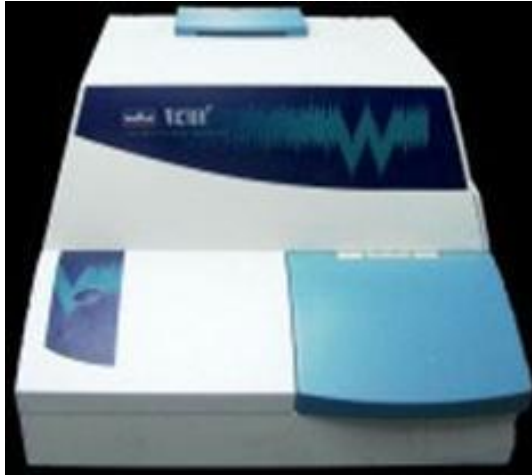
5.1 Fluoresenssin mittauslaitteen toimintaperiaate

Koska fluoresenssispektrometri mittaa kokonaisemissiota, on sen kannalta yhdenmukaista, onko kyseessä fluoresenssi- vai fosforesenssiprosessi. Fluoresenssispektrometrissä viritystila saadaan aikaan valon absorptiolla, joka virittää tutkittavan näytteen molekyylit ylemmälle elektroniselle tasolle (eksitaatio). Viritystilan purkautuessa laite detektoi syntyvän säteilyn intensiteettiä aallonpituuden funktiona. Ksenonlampulla saadaan aikaan voimakas valointensiteetti. Monokromaattorilla valitaan haluttu aallonpituus viritysvälilähteestä ja se ohjataan näytteeseen. Viritysvälilähteen vastapäätä on linssi, joka kerää emittoituvan säteilyn emissiopuolen monokromaattorin sisäänmenorakoon. Valomonistinputki toimii detektorina. Emissiosignaaliin vaikuttavia tekijöitä ovat: viritysvälilähteen intensiteetti, optisten komponenttien valon läpäisykyky ja valodetektorin herkkyys, jotka ovat valon aallonpituuden funktioita.²

Kahden monokromaattorin fluoresenssispektrometrillä voidaan mitata myös eksitaatiospektri. Tässä mittauksessa pidetään emissioaallonpituus vakiona ja muutetaan viritysvälilähteen aallonpituutta. Eksitaatiospektrissä emissiointensiteetin vaihtelu esitetään valitulla aallonpituudella, kun eksitaatioaallonpituus muuttuu. Emissiointensiteetti on sitä voimakkaampi ja sitä enemmän näytteessä on virittyneitä molekyylejä, mitä suurempi absorptio on. Eksitaatiospektri on emissiospektrin peilikuva.²

Wallacin monileimaus laskuri (kuva 2) on laite joka sopii kvantitatiiviseen valo-emission tai valo-absorption mittaamiseen. Se soveltuu luminesenssiin,

fluoresenssin, korkean herkkyyden aikaerotteisen fluoresenssin ja absorbanssin mittaukseen.²⁶



Kuva 2. Wallacin Victor monileimauslaskuri.²⁷

Aikaerotteista europiumkelaatin emissiota mitattaessa viritys tapahtui 340 nm ja emission mittausta 615 nm aallonpituudella. Virityksen jälkeen mitattiin 400 μ s ajan 400 μ s viiveajan jälkeen.

5.2 Käytetyt proteiinit

- Karboanhydraasi, naudan punasoluista, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
- Gammaglobuliini, naudan verestä, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
- Histoni, tyyppi II-A, vasikan kateenkorvasta, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
- BSA, Bovine Serum Albumin, naudan seerumin albumiini, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
- Pepsiini, sian vatsan limakalvolta, Sigma-Aldrich, Germany
- Trypsinogeeni, naudan haimasta, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO

Taulukko 1. Käytettyjen proteiinien molekyylipainot ja isoelektriset pisteet kirjallisuuslähteiden mukaan.

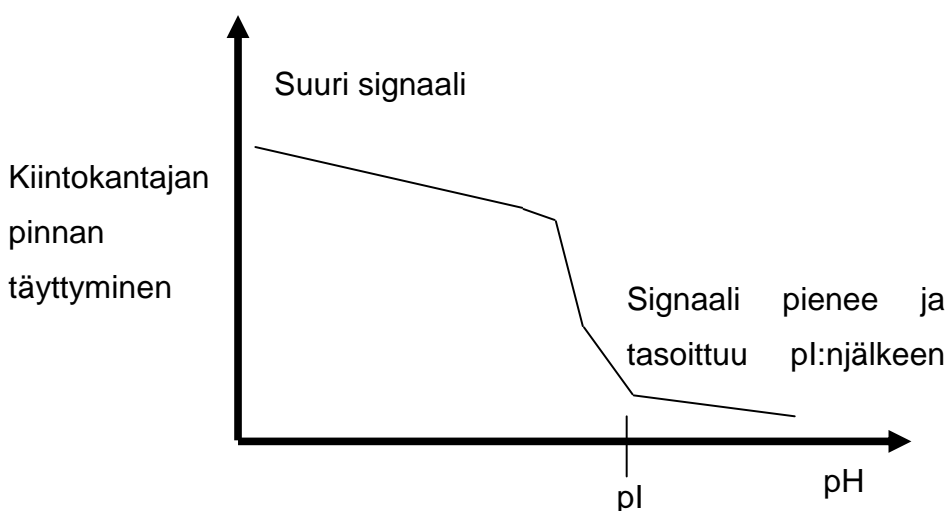
Proteiini	Molekyylipaino	Isoelektrinen piste
Naudan seerumin albumiini	66 kDa ²⁸	4,7 ²⁸
Histoni	11-21kDa ⁴³	11-12 ²⁹
Pepsiini	32 kDa ³⁰	2,2 ³¹
Karboanhydraasi	29 kDa ³²	5,85 ³³
Trypsinogeeni	25 kDa ³⁴	9,30 ³³
Gammaglobuliini	150 kDa ³⁵	6,4-8,8 ³⁶

6 MENETELMÄ

Tässä kappaleessa on esitetty kehitteillä olevan menetelmän toimintaperiaate yksityiskohtaisemmin sekä erilaiset optimoinnit, joita suoritettiin menetelmää kehittäessä ja testattaessa.

6.1 Menetelmän periaate

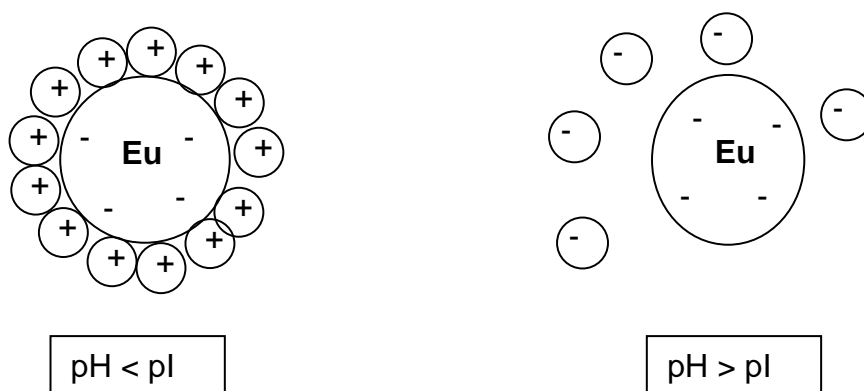
Kehitetyssä proteiinin isoelektrisen pisteen mittausmenetelmässä saadaan selville proteiinin pI aikaerotteista fluoresenssimittausta hyväksikäyttäen. Proteiinit adsorboituvat kiintokantajiin eri tavalla pH :sta riippuen ja se näkyy fluoresenssisignaalin. Toisin sanoen mitataan sitä, kuinka paljon kiintokantajan pinta on täyttynyt proteiineista (kuvio 7).



Kuvio 7. Fluoresenssisignaalin muutos pH :n suhteen.

Proteiinien varaukselliset vuorovaikutukset ovat minimissään proteiinin pI :ssä, joka tarkoittaa sitä, että pI :ssä saadaan usein proteiinin vahvin hydrofobinen sitoutuminen n kiintokantajaan. Signaalin määrä on kuitenkin suurin jo ennen proteiinin pI :tä, koska menetelmässä mitataan kiintokantajan täyttymistä. Vaikka adsorboituvien proteiinien määrä onkin pienempi matalissa pH :issa kuin pI :ssä, proteiinit purkautuvat partikkelin pinnalle niiden alhaisesta stabiilisuudesta johtuen ja täyttävät pintaa. pI :ssä proteiinien liukoisuus on myös minimissään eli

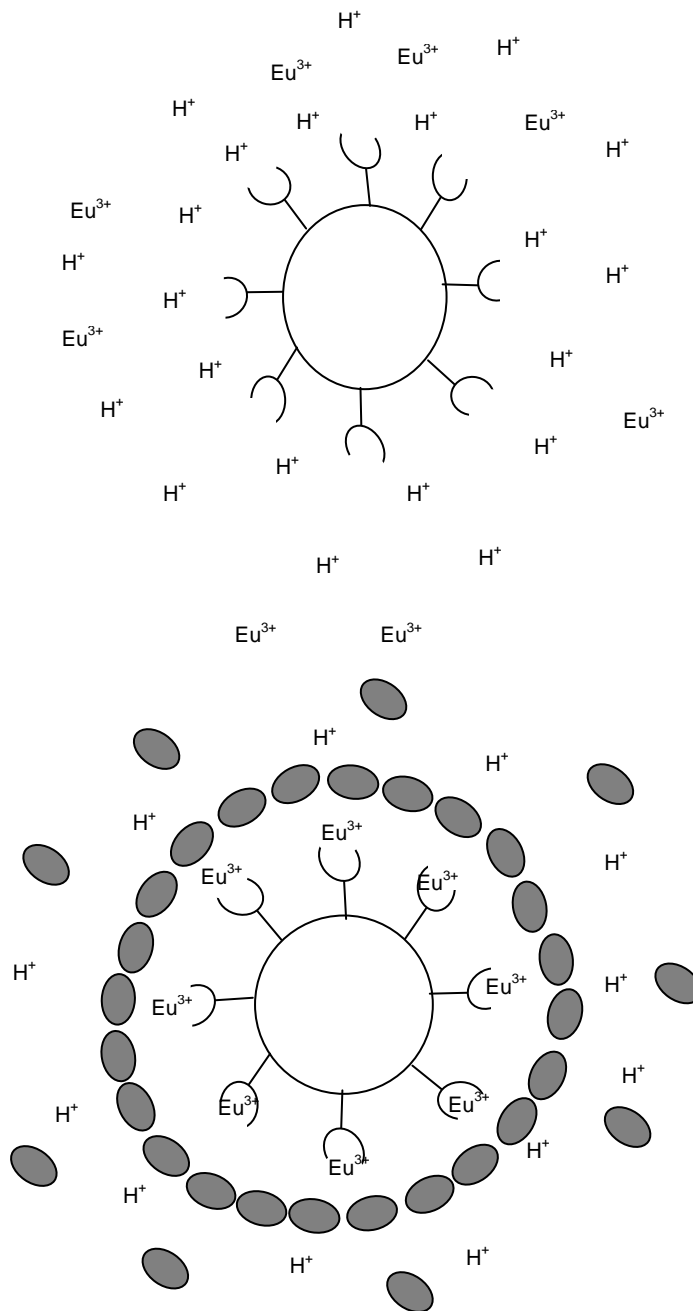
ne saostuvat helposti. Nettovaraus riippuu pH:sta, eli pH:n noustessa negatiivisten varausten määrä lisääntyy ja positiivisten varausten määrä vähenee. Tämä on syy siihen, miksi ennen pI :tä fluoresenssi on suuri ja tämän jälkeen pieni, sillä partikkelin varaus on negatiivinen. Positiivisesti varautuneet proteiinit adsorboituvat negatiivisesti varautuneeseen partikkeliin pI :n alapuolella, mutta negatiivisesti varautuneet proteiinit adsorboituvat heikosti negatiivisesti varautuneeseen partikkeliin pI :n yläpuolella (kuvio 8).



Kuvio 8. Proteiinien sitoutuminen Eu-partikkeliin.

Menetelmässä mikrotiitterilevyn kaivoihin kuivataan universaalipuskurin eli adsorptiopuskurin puskurikomponentit. Kaivoihin luodaan monessa optimoinnissa muuttuvat pH:t suunnilleen puolen pH-yksikön välein. Seuraavana lisätään proteiini ja Eu(III)-kelaatilla leimattu polystyreenipartikkeli. Tässä vaiheessa proteiini adsorboituu Eu-partikkeliin adsorptiopuskurin pH:sta riippuen. Proteiinit adsorboituvat hyvin negatiivisesti varautuneeseen proteiiniin ennen pI :tä mutta huonommin pI :n jälkeen, koska positiivisesti varautuneesta proteiinista muuttuu vähitellen negatiivisesti varautunut pH:n muuttuessa. Seuraavaksi lisätään dissosiaatiopuskuri, jolloin pH kuopissa laskee äkillisesti 0,75. Tällöin tapahtuu nopea Eu-kelaatin dissosiaatioprosessi, jossa ligandin karboksyyli-ryhmä protonoituu ja kordinaatiosidokset ligandin ja Eu^{3+} -ionin välillä katkeavat. Tällöin ligandi virittyy kyllä valolla, muttei kykene siirtämään energiaa Eu^{3+} -ionille, jolloin fluoresenssisignaali on heikko. Kuopissa, joissa proteiini oli sitoutunut hyvin partikkeliin, suojaa proteiini Eu-kelaattia matalalta pH:lta ja dissosiaatiota ei tapahdu helposti. Proteiinit estävät dissosiaatiopuskurin H^+ -

ionin pääsyn kelaattien luokse. Saadaan siis vahvempaa fluoresenssisignaalia. Proteiinin pI :n jälkeen Eu-kelaatit ovat yhä vähemmän suojattuina, koska proteiinit eivät ole adsorboituneet partikkeliin, jolloin dissosiaatiota tapahtuu helposti ja fluoresenssisignaali on heikko. Koska pH on laskettu 0,75:een, proteiinit alkavat adsorboitua partikkeleihin kaikissa kaivoissa, koska proteiinien ja partikkelien konaisvaraus on vastakkaismerkkinen toisiinsa nähden. Proteiiniadsorptio on kuitenkin hitaampi prosessi kuin dissosiaatio, joten mittausajankohtana saadaan vielä fluoresenssisignaalin muuttuminen näkyviin proteiinin pI :n suhteen. Tätä tapahtumaa on esitetty kuviossa 9.



Kuvio 9. Fluoresenssisignaalin muodostuminen. Ylemmässä kuvassa ei saada fluoresenssia, koska Eu^{3+} -ioni on dissosioitunut ligandista ja virittyvä ligandi ei tällöin kykene siirtämään energiaa Eu^{3+} -ionille. Alemmassa kuvassa proteiinit estävät dissosioivan puskurin pääsyn kelaattien luo, jolloin dissosiaatiota ei tapahdu ja saadaan suuri fluoresenssi.

6.2 Työn tarkoitus

Työssä on tarkoituksena kehittää uusi kokeellinen menetelmä proteiinin pI:n määrittämiseen. Kehitettävässä menetelmässä olisi tarkoitus kehittää kuoppalevy, johon olisi kuivattu adsorptiopuskurin puskurikomponentit. Näissä kuopissa olisi siis valmiina pH-gradientti, joihin käyttäjä lisäisi vain mitattavan proteiinin, nanopartikkelit ja dissosiaatiopuskurin, jonka jälkeen käyttäjä voisi mitata proteiinien pI:n edellä mainitulla tavalla. Menetelmän kehitys vaatii useita erilaisia optimointeja ja testejä. On testattava, miten kuivaus vaikuttaa pH-gradienttiin, mikä dissosiaatiopuskuri ja sen pitoisuus on optimaalisin, mikä nanopartikkelien ja proteiinin pitoisuus on optimaalisin ja milloin on sopiva ajankohta mitata fluoresenssia. On myös tutkittava nanopartikkelien ominaisuuksia eli mikä niiden varaus on ja kuinka stabiilina se säilyy olosuhteiden muuttuessa. On vertailtava, millainen tulkintatapa on helppo tulkittaessa fluoresenssisignaalia.

6.3 Amino-modifioitujen polystyreenipartikkelien leimaus Eu(III)kelaatilla

Amino-modifioidut polystyreenipartikkelit (halkaisijaltaan 240 nm) leimattiin 9-hampaisella Eu(III)-kelaatilla {2,2',2'',2'''-[4'-(4'''-fenyylisotiosyanaatti)-2,2':6,6''-terpyridiini-6,6''-diyyli]bis(metyylinitriili)}tetra(asetaatit)}europium(III). Partikkelit pestiin sentrifugoimalla (19 000g, 5 min) muutamia kertoja ennen leimausta. Eu(III)-kelaatit (n. 20 nmol) lisättiin 250 µl:aan 30 mM karbonaattipuskuria (pH = 9,9), joka sisältää 109 fmol partikkeleita. Yön yli kestäneen inkuboinnin jälkeen partikkelit pestiin vedellä sentrifugoimalla 19 000g 5 min ajan muutamia kertoja. Eu(III)-kelaattien määrä partikkeliä kohti määritettiin DELFIA (dissosiaatiotehostettu lantanidi immunomääritys)-liuoksella.

6.4 Zeta-potentiaali-mittaus

Zeta-potentiaalimittaus suoritettiin leimaamattomilla amino-modifioiduilla polystyreenipartikkeleilla ja 9-hampaisella Eu(III)-kelaatilla pintaleimatuilla partikkeleilla. Zeta-potentiaali mitattiin Zetasizer Nano Series Nano ZS -laitteella (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Iso-Britannia). Zeta-potentiaali

leimaamattomista amino-modifioituista polystyreenipartikkeleista mitattiin vedessä, ja 0,50 mM universaalipuskurissa viidessä eri pH:ssa. Zeta-potentiaali pintaleimatuista 9-hampaisista Eu(III)kelaateista (75 000 kelaattia/partikkeli, 44 pM) mitattiin vedessä.

6.5 Adsorptiopuskurin valmistus

Valmistettiin puskuriliuokseksi universaalipuskuria, joka sisältää usean puskuroivan komponentin ja näin ollen puskuroi laajalla pH-alueella. Universaalipuskuri sisältää sitruunahappoa, kaliumdivetyfosfaattia, tris (hydroksimetyyli) aminometaania, natriumtetraboraattia ja kaliumkloridia. Universaalipuskuri oli 0,10 M jokaisen komponentin suhteen. Natriumtetraboraatti liukeni hitaasti, joten seoksen annettiin liueta yön yli. Laimennettiin universaalipuskuria veteen 0,025 M:ksi. Säädettiin puskurien pH:t suunnilleen 0,5 pH-yksikön välein NaOH:n ja HCl:n avulla. Apuna käytettiin pH-mittaria.

6.6 Puskurikomponenttien kuivaus kuoppalevyille

96-kuoppalevyille pipetoitiin 0,0125 M universaalipuskuria 2,8 µl/kuoppa ja kutakin pH:ta 3 rinnakkaista kuoppaa. Jokainen optimointi ja testi vaati omanlaisensa pH-gradientin, joten levyjä valmistettiin käyttötarkoitukseen sopiviksi universaalipuskurin pH:n suhteen. Kuoppalevyt asetettiin lämpökaappiin (+50 °C) kuivumaan yön yli. Tämän jälkeen kuoppalevyt olivat valmiita määrittämisiksi varten.

6.7 pH:n muutoksen testaus

Kuivauksen aikana HCl haihtuu veden mukana, jolloin myös pH voi muuttua, joten testattiin kuivauksen vaikutusta pH:hon. Testi tehtiin kuivatulle kuoppalevyille, jossa oli kaikki valmistetut universaalipuskurin pH:t. Pipetoitiin kaikkiin kuoppiin 70 µl vettä ja ravisteltiin kuoppalevyravistelijalla 2 min. Siirrettiin liuokset muovipulloihin jotta voitiin mitata pH. Tästä eteenpäin

mainittavat pH:t ovat pH:ita kuivauksen ja veden lisäyksen jälkeen, ellei tekstissä toisin mainita.

6.8 Proteiiniliuosten valmistus

Käytettäväksi proteiineiksi valittiin sellaisia proteiineja, joilla on kirjallisuuden mukaan eri pl:t, jotta ne kuvastaisivat menetelmän toimivuutta parhaiten. Valituista proteiineista valmistettiin sopivat varastoliuokset veteen seuraavilla pitoisuuksilla:

- 20 mg/ml karboanhydraasi
- 79 mg/ml γ G
- 70 mg/ml histoni
- 70 mg/ml BSA
- 17,25 mg/ml pepsiini
- 20 mg/ml trypsinogeeni

6.9 Proteiinin isoelektrisen pisteen mittaamenetelmän kehitys

6.9.1 Proteiinilaimennosten valmistus mittauksiin

Mittauksia varten valmistettiin eri pitoisuuksia proteiineista seuraavasti:

Varastoliuoksen pitoisuus ja määrä oli jokaisella proteiinilla eri, joten ensimmäinen laimennos 700 mg/l valmistettiin veteen eri tavalla kunkin proteiinin kohdalla (kuvio 36 liitteessä 1).

Näistä laimennoksista valmistettiin loput laimennokset 70, 7, 0,7, 0,21 ja 0,07 mg/l veteen samalla tavalla jokaisen proteiinin kohdalla (kuvio 37 liitteessä 2).

6.9.2 Dissosiaatiopuskurin optimointi

Testattiin erilaisten dissosiaatiopuskureiden vaikutusta fluoresenssiin BSA:n pitoisuuksilla 0, 0,21 ja 70 mg/l. Testi tehtiin kuivatuille kuoppalevyille, joissa oli pH:t 3,63, 5,04, 6,70 ja 8,86.

Valmistettiin BSA-laimennokset mikrosentrifugiputkiin. Pipetoitiin kuoppiin 70 μ l eri BSA -pitoisuuksia niin, että kutakin tuli vuorotellen 1 rivi. Perään pipetoitiin 5 μ l $8,7 \cdot 10^5/\mu$ l Eu-partikkeli-liuosta jokaiseen kuoppaan. 5 μ l:n tilavuus sisältää partikkeleita $4,3 \cdot 10^6$ kappaletta. Ravisteltiin kuoppalevyravistelijalla 1 min. Lisättiin 10 μ l jotakin seuraavista dissosiaatiopuskureista:

- 0,50 M glysiini pH 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75 ja 2,00
- 0,059; 0,177 ja 0,59 M HCl
- 0.50 M Oksaalihappo pH 0,50; 0,75 ja 1,00

Ravisteltiin kuoppalevyt kuoppalevyravistelijalla ja mitattiin fluoresenssia noin 30 minuutin kuluttua.

6.9.3 Glysiinin pitoisuuden optimointi

Testattiin glysiinin määrän vaikutusta fluoresenssin stabiilisuteen eli signaalia ajan funktiona kuivatulla kuoppalevyillä (pH:t 5,04, 6,70, 8,86 ja 9,75) histonin pitoisuuksilla 0 ja 0,70 mg/l.

Valmistettiin histoni-laimennos mikrosentrifugiputkeen. Pipetoitiin 6 kuoppalevyn riville vuorotellen histoni-pitoisuuksia 0 mg/l ja 0.7 mg/l 70 μ l. Lisättiin kaikkiin kuoppiin Eu-partikkeli-liuos $8,7 \cdot 10^5/\mu$ l pitoisuudella. Pipetoitiin molempiin histoni-pitoisuuksiin 10, 30 ja 90 μ l 0,50 M glysiiniä (pH 2). Tehtiin mittaukset noin 8, 23, 48 ja 62 minuutin kuluttua glysiinin lisäyksestä.

6.9.4 Eu-partikkeli-pitoisuuden optimointi

Tehtiin kuivatuille kuoppalevyille (pH:t 3,63, 5,04, 6,70 ja 8,86) mittaus, jossa testattiin Eu-partikkelien määrän vaikutusta tulokseen BSA:n pitoisuuksilla 0, 0,21 ja 70 mg/l.

Valmistettiin BSA-laimennokset mikrosentrifugiputkiin. Pipetoitiin kuivatulle kuoppalevyille 70 μ l BSA-laimennoksia. Pipetoitiin 5 μ l $8,7 \cdot 10^5/\mu$ l ja $1,7 \cdot 10^6/\mu$ l Eu-partikkeli-liuosta jokaiseen BSA-pitoisuuteen. 5 μ l:n tilavuus sisältää partikkeleita $8,7 \cdot 10^5/\mu$ l pitoisuudella $4,3 \cdot 10^6$ kappaletta ja $1,7 \cdot 10^6/\mu$ l pitoisuudella $8,5 \cdot 10^6$ kappaletta. Pipetoitiin kaikkiin kuoppiin 10 μ l 0.50 M glysiiniä (pH 0.75). Tehtiin mittaus noin 30 min kuluttua.

6.9.5 Proteiinipitoisuuden optimointi

Tehtiin kuivatuille kuoppalevyille (pH:t 3,63, 5,04, 6,70 ja 8,86) mittaus, jossa optimoitiin proteiinipitoisuutta, jossa proteiinien pI:n havaitseminen kuvaajilta olisi selkeintä.

Valmistettiin proteiinilaimennokset 0, 0,07, 0,21, 0,70 ja 70 mg/l mikrosentrifugiputkiin kaikista proteiineista. Pipetoitiin 70 μ l proteiinilaimennoksia kuivatulle kuoppalevyille. Lisättiin kaikkiin kuoppiin 5 μ l $1,7 \cdot 10^6/\mu$ l Eu-partikkeli-liuosta. Pipetoitiin kuoppiin 10 μ l 0.50 M glysiiniä (pH 0.75). Tehtiin mittaus noin 30 minuutin kuluttua viimeisestä glysiinin lisäyksestä.

6.10 Proteiinien isoelektrisen pisteen määrittäminen erilaisilla analysointimenetelmillä

Lopullisessa määrittäyksessä on mahdollista analysoida proteiinien isoelektrinen piste tuloksista kahdella eri tavalla, suoraan saadusta signaalista tai ottaen tausta huomioon signaali/tausta-suhdetta analysoitaessa. Suoritus ennen tuloksia analysoitaessa on kuitenkin täysin identtinen eri tapojen välillä.

Valmistettiin kaikista proteiineista laimennokset 0, 0,21 ja 70 mg/l mikrosentrifugiputkiin. Pipetoitiin 70 μ l proteiinilaimennoksia kuivatuille

kuoppalevyille. Tässä mittauksessa kuivatuilla kuoppalevyillä oli jokaiselle proteiinille omanlaisensa pH-gradientti, jossa pH:t olivat etenkin proteiinin kirjallisuusarvon pI :n kohdalla suunnilleen 0,5 pH-yksikön välein. Lisättiin kaikkiin kuoppiin 5 μ l $1,7 \cdot 10^6/\mu$ l Eu-partikkeli-liuosta. Pipetoitiin kaivoihin 10 μ l 0,50 M glysiiniä ($pH = 0,75$). Tehtiin mittaus noin 30 minuutin kuluttua viimeisestä glysiinin lisäyksestä.

6.11 Proteiinin teoreettisen pI :n laskeminen

Etsittiin NCBI:n²⁵ sivulta kunkin proteiinin aminohapposekvenssi (taulukko 2) käyttäen proteiinin nimeä ja alkuperää. Proteiineja löytyi useita vaihtoehtoja kunkin proteiinin kohdalla, joten joukosta valittiin yksi. NCBI:n sivuilta saatu proteiinien aminohapposekvenssi syötettiin ExPASy Proteomics Serveriin²⁴.

Taulukko 2. Proteiinien aminohapposekvenssit.

Proteiini	Sekvenssi
Naudan seerumin albumiini	<p>mkwvtfisll llfssaysrg vfrdthkse iahrfdlge ehfkgvlia fsqylqqcpf</p> <p>dehvklnel tefaktcvad eshagceksl htlfgedelck vaslretygd madccekqep</p> <p>erneclshk ddspdlpklk pdpntlcdef kadekkfwgk ylyeiarrhp yfyapellyy</p> <p>ankyngvfqe ccqaedkgac llpkietmre kvltssarqr lrcasiqkfg eralkawsva</p> <p>rlsqkfpkae fvevtklvtd ltkvhkeccch gdllecaddr adlakycidn qdtissklke</p> <p>ccdkpleks hciaevkda ipenlpplta dfaedkdvck nyqeakdafl gsflyeysrr</p> <p>hpeyavsvll rlakeyeatl eeccakddph acystvfdkl khlvdepqnl ikqncdqfek</p> <p>lgeygfqnal ivrytrkvpq vstptlivevs rslgkvgrc ctkpesermp ctedylsil</p> <p>nrlcvlhekt pvsekvtkcc teslvnrpc fsaltpdety vpkafdeklf tfhadictlp</p> <p>dtekqikkqt alvellkhkp kateeqlktv menfvafvdk ccaaddkeac favegpklvv</p> <p>stqtala³⁷</p>

(jatkuu)

Taulukko 3. Proteiinien aminohapposekvenssit (jatkuu).

Pepsiini	igdeplenyl dteyfgtigi gtpaqdftvi fdtgssnlwv psvyccslac sdhnqfnpdd sstfeatxqe lsitygtgsm tgilgydtvq vggisdtnqi fglsetepgs flyyapfdgi lglaypsisa sgatpvfdnl wdqglvsqdl fsyylssndd sgsvllggi dssyytgsln wvpvsvegyw qitldsitmd getiacsggc qaivdtgtsl ltgptsaian iqsdigasen sdgemviscs sidslpdivf tingvqypis psayilqddd sctsgfegmd vptssgelwi lgdvfirqyy tvfdrannkv glapva ³⁸
Gammaglobuliini	Ei löydetty sekvenssiä
Karboanhydraasi	mshhwgygkh ngpehwhkdf piangerqsp vdidtkavvq dpalkplalv ygeatsrrmv nnghsfnvey ddsqdkavlk dgpltgtyrl vqfhfhwgss ddqgsehtvd rkkyaaelh vhwntkygdf gtaaqqpdgl avvgvflkv danpalqkvl daldsiktkg kstdfpnfdp gslpnvldy wtypgsltp pllesvtwiv lkepisvssq qmlkfrtlnf naegepellm lanwrpaqpl knrqvrgfpk ³⁹
Trypsinogeeni	ivggytcgan tpyqvslns gyhfcggsli nsqwvsaah cyksgiqvrl gedninveg neqfisasks ivhpsynsnt lndimlikl ksaaslnsr v asislptsca sagtqclisg wgntkssgts ypdvlkclka pilsdsscks aypgqitsnm fcagyleggk dscqgdsggp vvcsgklqgi vswgsgcaqk nkpgvytkvc nyvswikqti asn ⁴⁰
Histoni	msgrgktggk arakaktrss raglqfpvgr vhrllrkgnv aervgagapv ylaavleylt aeilelagna ardnkktrii prhlqlavrn deelnlkllg vtiaqggvlp niqavllpkk tekavkak ⁴¹

γ G ja histoni ovat proteiinien seoksia. γ G:lle ei löydetty aminohapposekvenssiä lainkaan. Histonin proteiiniseoksessa on eri tyyppisiä proteiineja; H1, H2a, H2b, H3 ja H4. Näille kaikkille tietokannasta löytyvät aminohapposekvenssit ovat lähellä toisiaan, joten tarkasteluun valittiin näistä yksi (H2a). Sigma-Aldrichin merkintä tyyppi-II A ei siis tarkoita, että kyseessä olisi H2a tyyppinen histoni.

7 TULOKSET JA ARVIOINTI

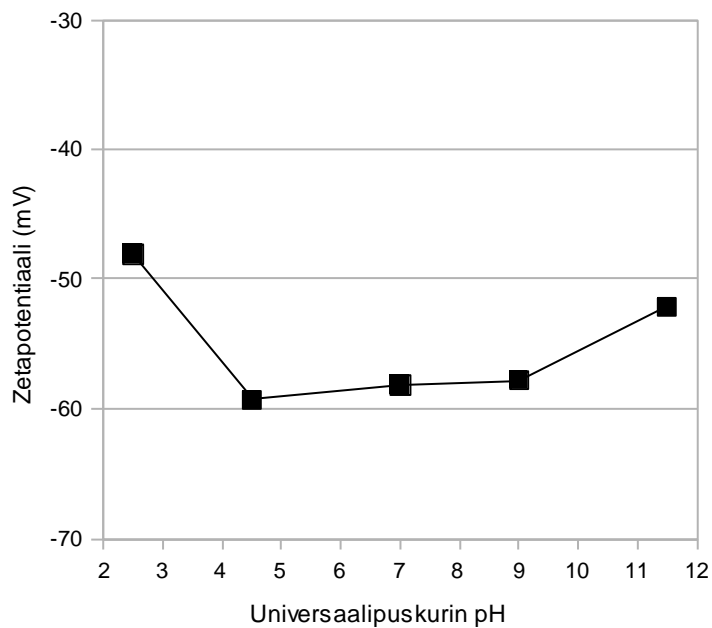
Tässä kappaleessa esitetään mittauksista ja optimoinneista saatuja tuloksia ja tulkitaan niitä.

7.1 Amino-modifioitujen polystyreenipartikkelien merkintä Eu(III)-kelaatilla

Amino-modifioidut polystyreenipartikkelit sisältävät Eu(III)-kelaattia 21 000 kpl/partikkeli.

7.2 Zeta-potentiaolimittaus

pH:n muutos ei vaikuttanut leimaamattoman partikkelin zeta-potentiaaliin kovinkaan suuresti, kuten kuviosta 10 voidaan nähdä. Partikkelit ovat siis laajalla pH-alueella negatiivisia, jolloin kehitetyn menetelmän proteiiniadsorptioperiaate toimii samoin koko pH-skaalalla. Positiiviset proteiinit sitoutuvat siis negatiiviseen partikkeliin ennen pI :tä, mutta eivät enää pI :n jälkeen, jolloin proteiinien varaus on negatiivinen. Testattiin myös, vaikuttaako leimaus partikkelin zeta-potentiaaliin, jottei leimaus muuta partikkelin varausta ja täten koko menetelmän toimintaperiaatetta. Zeta-potentiaali Smoluchowskin approksimaation mukaan oli leimaamattomilla polystyreenipartikkeleilla vedessä -55 mV ja Eu(III)-kelaatilla leimatuilla -43 mV. Leimaus ei siis vaikuta huomattavasti partikkelin Zeta-potentiaaliin. Proteiinien adsorboituminen partikkelin pintaan muuttaa zeta-potentiaalia, mutta tämä tapahtuu vasta adsorption jälkeen, jolloin sillä ei enää ole huomattavaa vaikutusta mittausperiaatteeseen.



Kuvio 10. Leimaamattoman aminomodifioidun polystyreenipartikkelin zeta-potentiaali Smoluchowskin approksimaation mukaan universaalipuskurin pH:n funktiona.

7.3 Universaalipuskurin pH:n muutos kuivauksen aikana

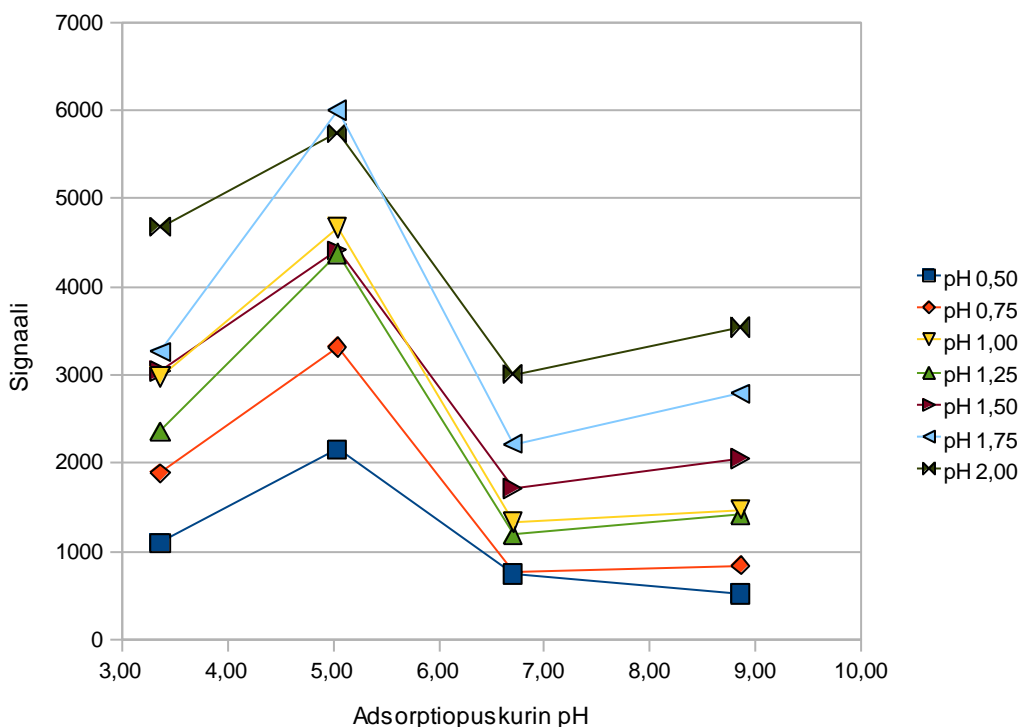
Taulukosta 3 voidaan nähdä, että kaikkien liuosten pH lähestyi neutraalia kuivauksen jälkeen. Tämä johtuu siitä, että HCl haihtuu helposti jo 20 °C:ssa⁴², ja kuivaus 50 °C:ssa lisää haihtuvuutta entisestään. Myös reilu laimentaminen muuttaa pH:ta.

Taulukko 4. Universaalipuskurin pH:n muutos kuivauksen aikana.

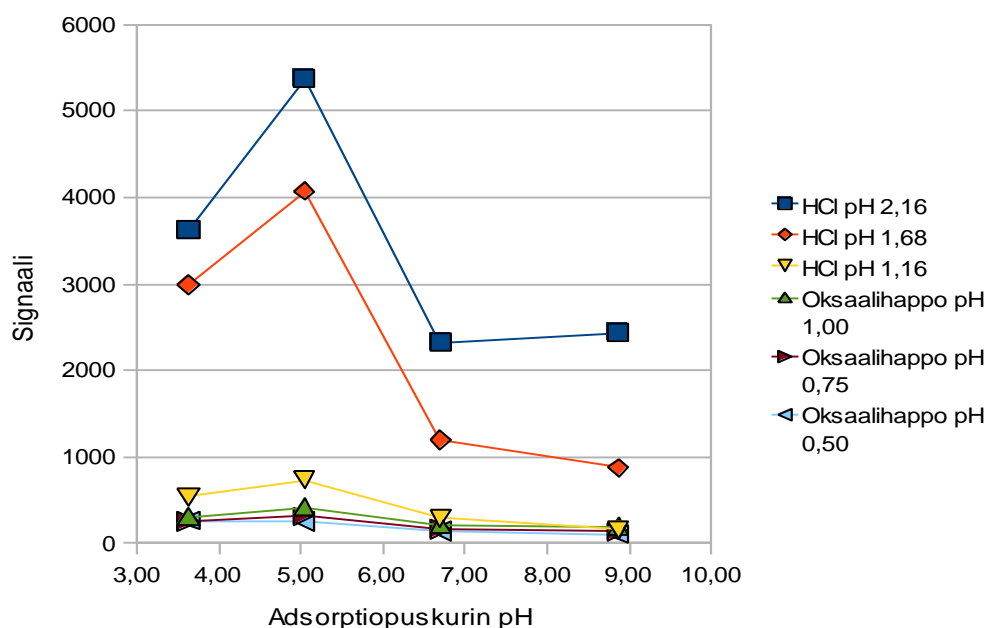
Alkuperäinen pH	pH kuivauksen jälkeen
1,00	3,63
1,51	3,60
2,00	3,58
2,51	3,59
2,99	4,11
3,51	4,32
3,99	4,67
4,49	5,04
5,02	5,69
5,51	6,02
5,99	6,36
6,50	6,70
6,99	7,09
7,50	7,46
8,00	7,76
8,50	8,02
8,99	8,41
9,50	8,68
9,99	8,85
10,50	8,86
10,99	9,21
11,50	9,32
12,00	9,34
12,50	9,47
12,80	9,75
13,16	10,73

7.4 Dissosiaatiopuskurin optimointi

Testattiin erilaisia dissosiaatiopuskureita BSA:n pitoisuuksilla 0, 0,21, 70 mg/l kuivatuilla kuoppalevyillä, joissa oli pH:t 3,63, 5,04, 6,70 ja 8,86. Koska signaalin pienentyminen BSA:n pl:n jälkeen oli havaittavissa huomattavasti selkeämmin BSA:n pitoisuudella 0,21 mg/l kuin pitoisuudella 70 mg/l, on 0,21 mg/l valittu tarkasteltavaksi tuloksia arvioitaessa. Koska eri dissosiaatiopuskureita oli niin paljon, on ne jaettu kahteen eri kuvaajaan selkeyden vuoksi. Kuten kuvioista 11 ja 12 voidaan nähdä, on tulos parhain 0.5 M glysiinin matalilla pH:illa, sillä signaali pysyy korkealla ennen BSA:n pl:tä, ja laskee sekä tasoittuu pl:n jälkeen. Erityisesti glysiinin pH:lla 0,75 tulos on hyvä, koska fluoresenssi pysyy tasaisen matalana pH:sta 6,70 pH:hon 8,86 mentäessä. Oksaalihappo taas dissosioi liiankin hyvin, koska fluoresenssi on hyvin pientä ja signaalin nousu on tuskin havaittavissa.

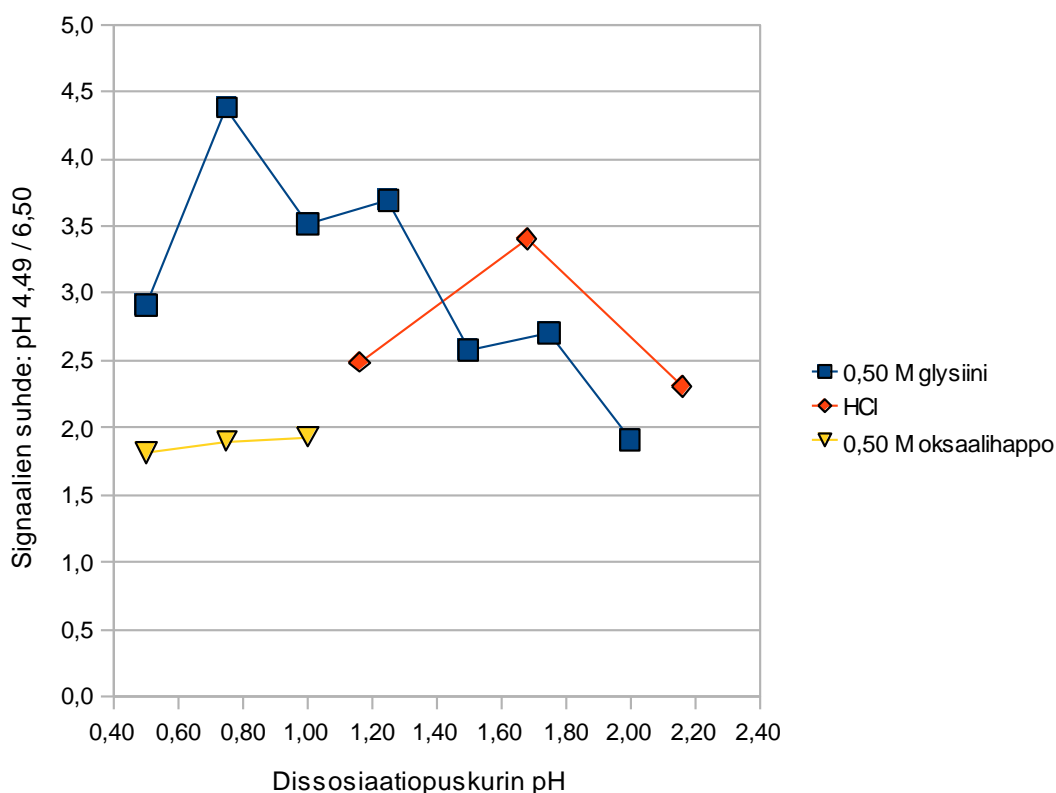


Kuvio 11. Dissosiaatiopuskurin optimointi 1: fluoresenssi adsorptiopuskurin (0,50 M glysiini) pH:n funktiona. BSA:n pitoisuus kaivoissa 0,21 mg/l.



Kuvio 12. Dissosiaatiopuskurin optimointi 2: fluoresenssi adsorptiopuskurin (0,50 M oksaalihappo tai HCl) pH:n funktiona. BSA:n pitoisuus kaivossa 0,21 mg/l.

Koska positiivinen proteiini adsorboituu hyvin negatiivisesti varautuneeseen partikkeliin ennen pI :tä, ja pI :n jälkeen adsorboituminen heikkenee proteiinin muuttuessa negatiivisesti varautuneeksi, on asiaa havainnollistettu vielä kuvaajalla, jossa on esitetty fluoresenssisignaalien suhde pH:ssa 5,04 ja pH:ssa 6,70 dissosiaatiopuskurin pH:n funktiona (kuvio 13). Suuri signaalien suhde kertoo hyvästä dissosiaatiopuskurin toiminnasta, sillä tällöin adsorptio on voimakasta ennen pI :tä, mutta pian sen jälkeen adsorboituminen laskee vähitellen. Kuvaajalta voidaan todeta sama kuin edellä; paras dissosiaatiopuskuri on 0,50 M glysiini pH:lla 0,75.

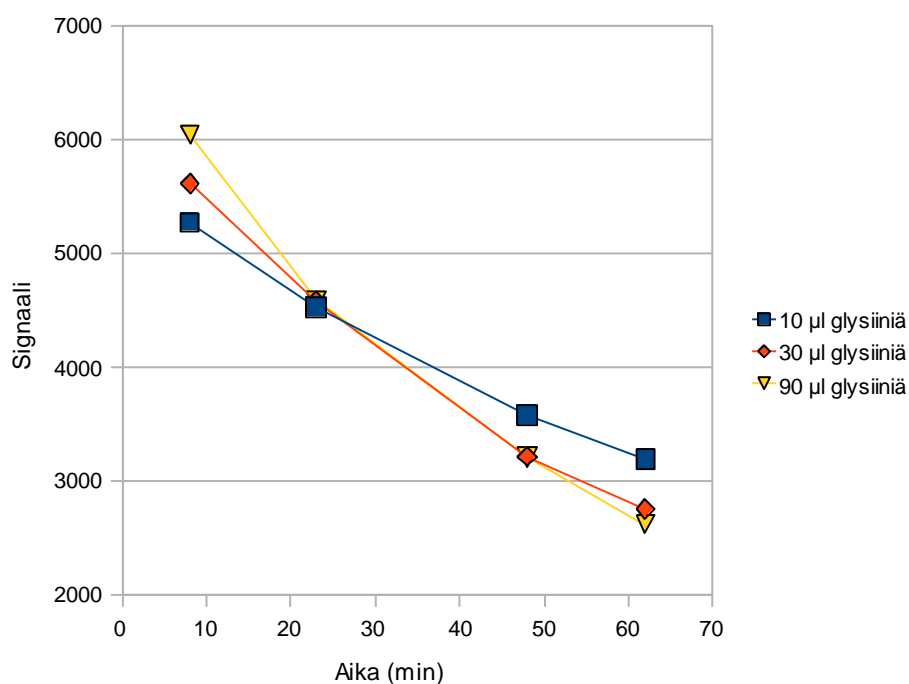


Kuvio 13. Dissosiaatiopuskurin optimointi 3: signaalien suhde (pH 4,49 / pH 6,50) dissosiaatiopuskurien pH:n funktiona. BSA:n pitoisuus kaivoissa 0,21 mg/l.

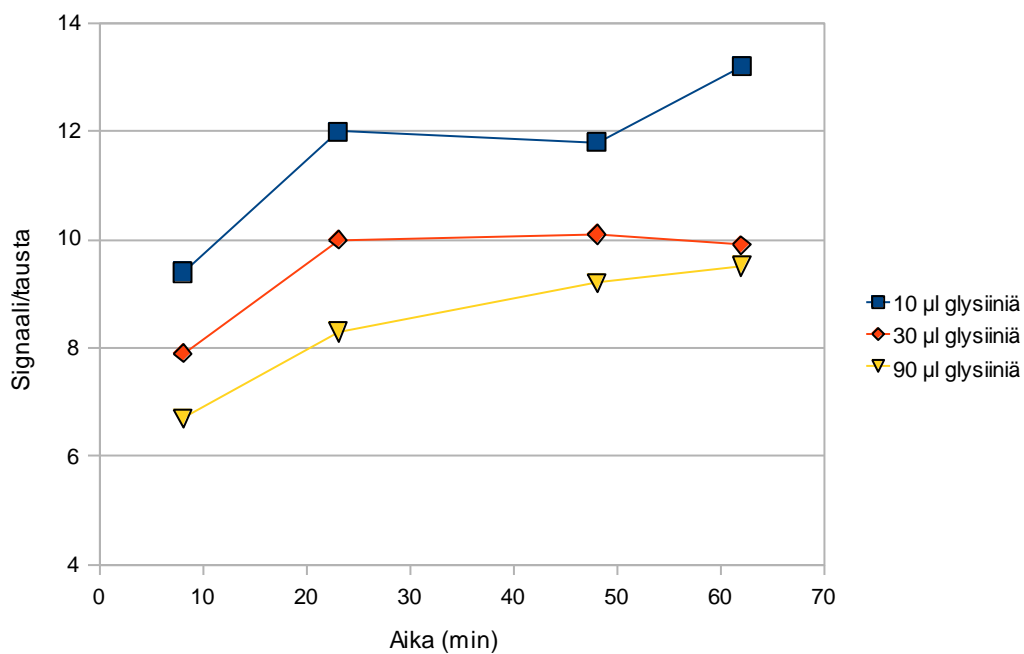
7.5 Glysiinin pitoisuuden optimointi

Mitattiin glysiinin määrän vaikutusta signaalin stabiilisuuteen eli signaalia ajan funktiona.

Kuviosta 14 nähdään, että signaali pysyy stabiileimpana 10 µl glysiinin määrällä ja huonoin stabiilisuus taas on 90 µl glysiinin määrällä, vaikkei stabiilisuudessa olekaan kovinkaan suuria eroja. Kuviosta 15 nähdään, että signaali/tausta – suhde on suurin 10 µl glysiinimäärällä, joten tämä valittiin glysiinin tilavuudeksi mittauksiin. Signaali/tausta -suhde on stabiili kaikilla glysiinipitoisuuksilla 23-48 minuutin kuluttua glysiinin lisäyksestä kaivoon (kuvio 15). Sopiva mittausajankohta saavutetaan noin 20 minuutin kuluttua glysiinin lisäyksestä kaivoihin, jolloin saavutetaan signaali/tausta-suhteen maksimi.



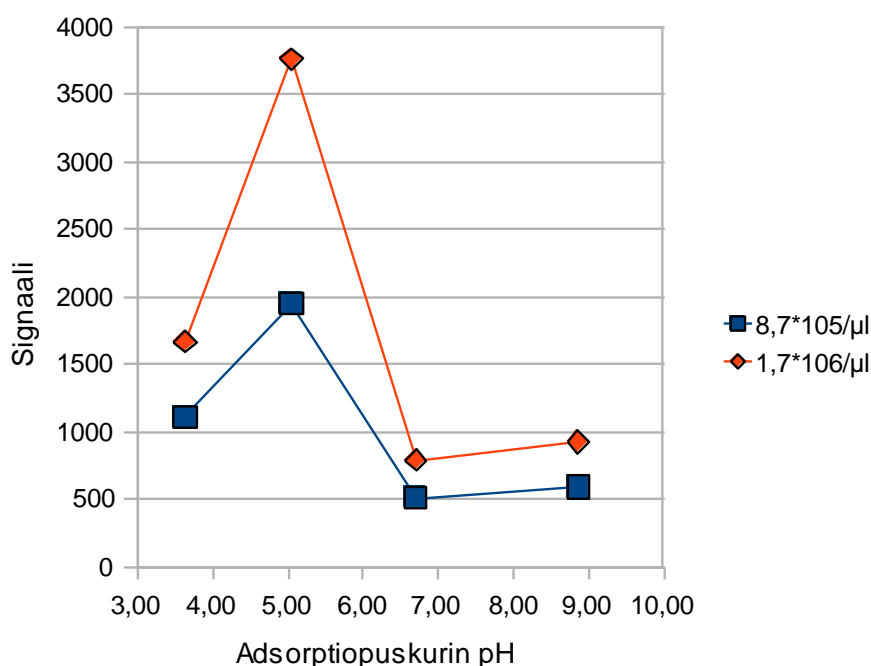
Kuvio 14. Glysiinin määrän optimointi: 0,50 M glysiinin (pH = 2) fluoresenssi ajan funktiona. Histonin pitoisuus kaivoissa 0,21 mg/l.



Kuvio 15. Mittausajankohdan optimointi: 0,50 M glysiinin (pH = 2) signaali/tausta -suhde ajan funktiona. Histonin pitoisuus kaivoissa 0,21 mg/l.

7.6 Eu-partikkeli-pitoisuuden optimointi

Kuten kuviosta 16 voidaan nähdä, saadaan $1,7 \cdot 10^6/\mu\text{l}$ Eu-partikkeli-pitoisuudella huomattavasti suurempi signaali ja signaalin vähentyminen tasaisen matalalle BSA:n pl:n jälkeen. Signaalien suhde pH:ssa 4,49 ja pH:ssa 6,50 on 4,8 partikkelien $1,7 \cdot 10^6/\mu\text{l}$ pitoisuudella ja 3,8 $8,7 \cdot 10^5/\mu\text{l}$ pitoisuudella. Varsinaiseen kehitettävään menetelmään valittiin siis Eu-partikkeli-pitoisuudeksi $1,7 \cdot 10^6/\mu\text{l}$, koska sillä saavutetaan korkeampi signaalien suhde ja fluoresenssi.



Kuvio 16. Eu-partikkeli-pitoisuuden optimointi: fluoresenssi adsorptiopuskurin pH:n funktiona. BSA:n pitoisuus kaivoissa 0,21 mg/l.

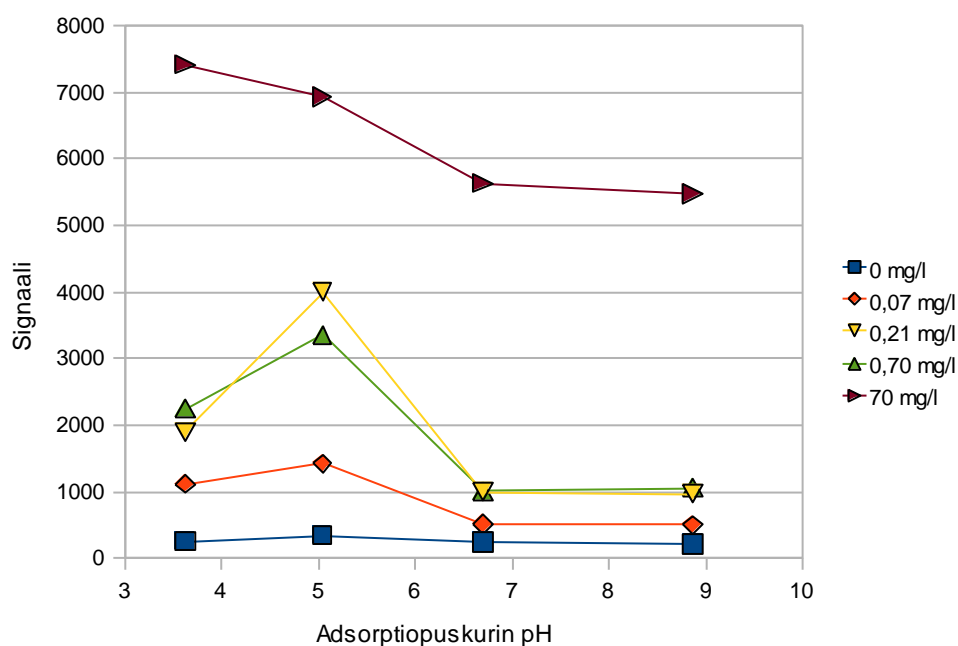
7.7 Proteiinipitoisuuden optimointi

Tässä määrittäksessä haettiin sopivaa proteiinipitoisuutta, jossa kaikilla proteiineilla isoelektrisen pisteen havaitseminen olisi mahdollisimman selkeä. Jokainen proteiini piirrettiin omaan kuvaajaansa, jotta asiaa voidaan tarkastella erikseen kunkin proteiinin kohdalla ja tehdä lopuksi valinta kaikki proteiinit huomioon ottaen.

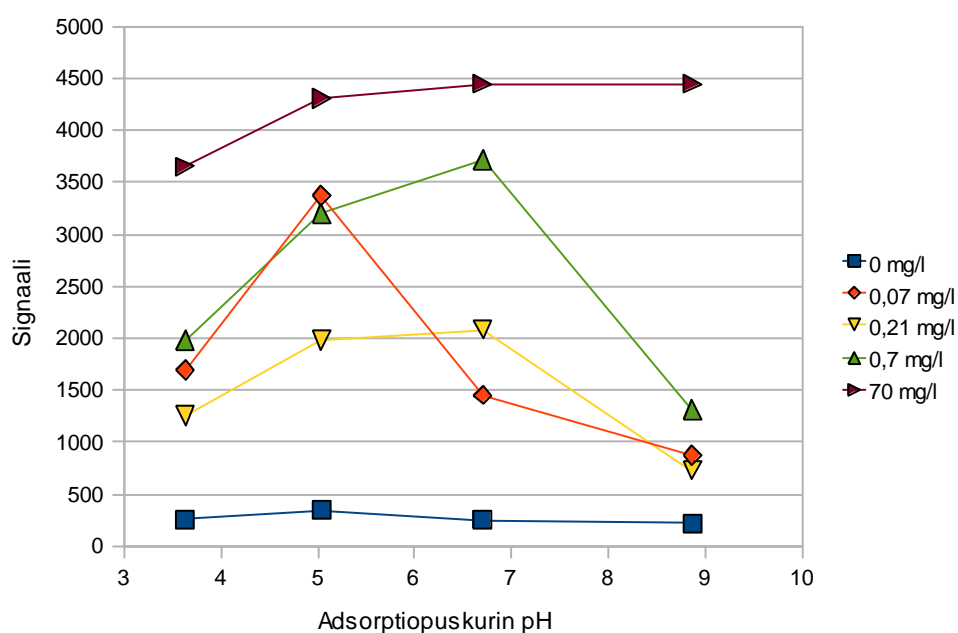
Proteiinipitoisuus vaikutti suuresti fluoresenssisignaalin määrään, vaikka voisi ajatella, että jos pieni pitoisuus riittää "täyttämään" partikkelin pinnan, ei suuremmat pitoisuudet enää nostaisi fluoresenssisignaalin määrää. Näin kuitenkin käy, koska suurissa pitoisuuksissa proteiinipartikkeliyhdistelmän lähelläkin olevat irtonaiset tai löyhästi adsorboituneet proteiinit estävät dissosiaatiopuskurin pääsyn protonoimaan karboksyyli ryhmää. Suurissa pitoisuuksissa partikkelin ligandien protonoitumista estämässä on suurempi "kerros" proteiinia kuin pienemmissä pitoisuuksissa. Pitoisuus vaikuttaa myös proteiinien asettautumiseen partikkelin pintaan, suurissa pitoisuuksissa proteiinit asettuvat pitkä akseli kohtisuorassa pintaa vasten, kun taas pienemmissä pitoisuuksissa adsorptio voi tapahtua lyhyt akseli kohtisuorassa pintaa vasten.

Proteiinipitoisuudella 0,21 mg/l on isoelektrisen pisteen havaitseminen kaikkein selkeintä, koska signaali on suuri ennen proteiinin pI :tä ja pI :ssä, ja pienenee tasaisen matalalle tämän jälkeen useimpien proteiinien kohdalla. Vaikka tämä pitoisuus ei ole kaikkien proteiinien kohdalla se paras vaihtoehto, haluttiin mittauksiin valita yksi yleisimmin toimivista pitoisuuksista. Se, ettei pitoisuus 0,21 mg/l toimi kaikilla proteiineilla yhtä hyvin, johtuu siitä, että kaikkien proteiinien molekyyllipainot, koko ja stabiilisuus on eri. Nämä kaikki tekijät taas vaikuttavat adsorptioon. Suuret proteiinit, kuten γG ja BSA, ovat vähemmän stabiileja kuin pienet proteiinit, jolloin niiden sitoutuminen kiinteään partikkeliin tapahtuu helpommin hydrofobisten vuorovaikutusten kautta. Tämä näkyy kuvaajilta, sillä näillä proteiineilla on selkeästi suuri adsorptio partikkeliin pI :n kohdalla, mutta sen yläpuolella ja alapuolella sitoutuminen on vähäisempää. Pienemmillä proteiineilla adsorptio perustuu enemmän ionisten varausten vuorovaikutuksiin, jolloin adsorpoituminen on kohtuullisen suurta ennen proteiinin pI :tä ja sen lähettyvillä, mutta laskee tasaisen matalalle pI :n jälkeen. Suuria proteiineja mahtuu pinnalle vähemmän, jolloin niiden pitoisuus voisi olla pienempi liuoksessa kuin pienten proteiinien kohdalla.

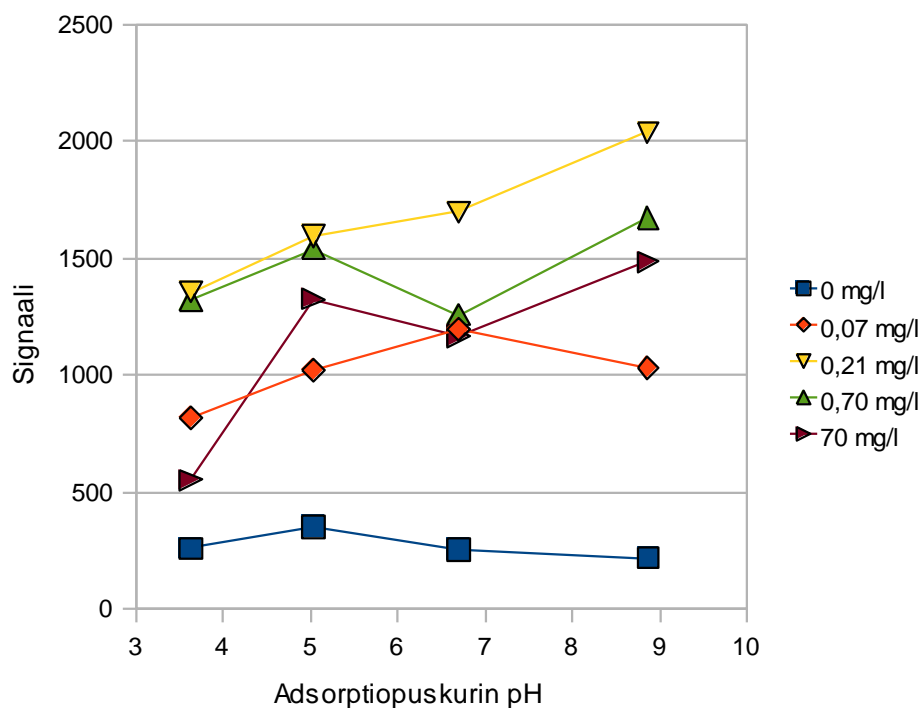
Paras pH proteiinien kvantitointiin on noin pH 5, koska silloin saadaan kaikilla proteiineilla suuri signaali pienellä pitoisuudella.



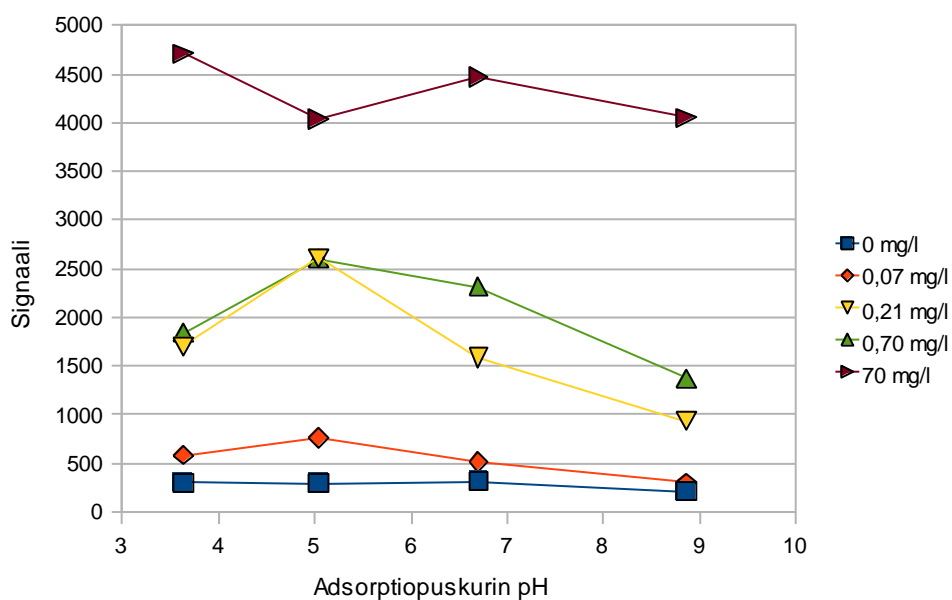
Kuvio 17. Proteiinipitoisuuden optimointi BSA:lle: fluoresenssi adsorptiopuskurin pH:n funktiona.



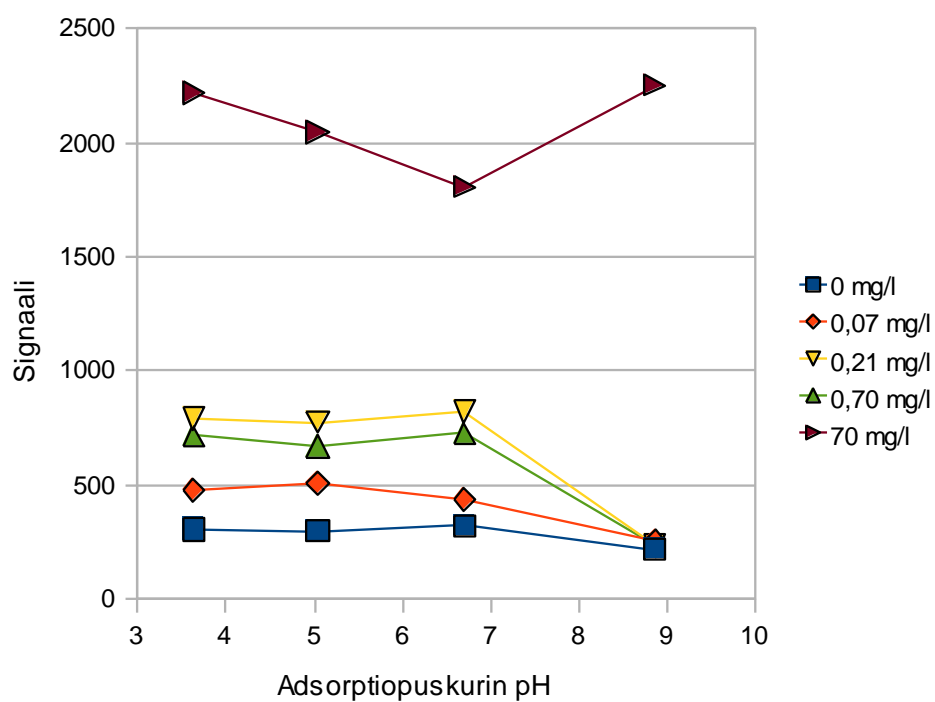
Kuvio 18. Proteiinipitoisuuden optimointi γ G:lle: fluoresenssi adsorptiopuskurin pH:n funktiona.



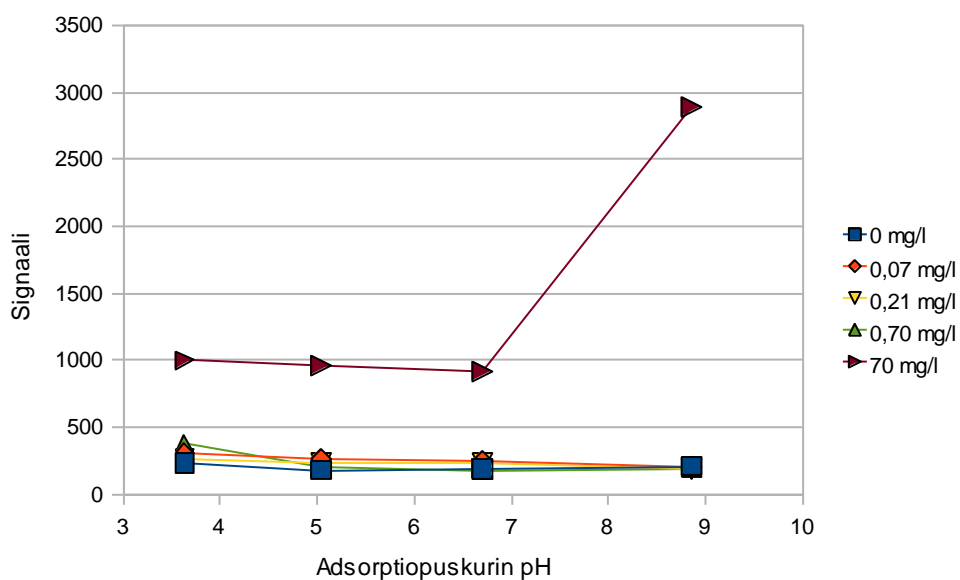
Kuvio 19. Proteiinipitoisuuden optimointi histonille: fluoresenssi adsorptiopuskurin pH:n funktiona.



Kuvio 20. Proteiinipitoisuuden optimointi karboanhydraasille: fluoresenssi adsorptiopuskurin pH:n funktiona.



Kuvio 21. Proteiinipitoisuuden optimointi trypsinogeenille: fluoresenssi adsorptiopuskurin pH:n funktiona.



Kuvio 22. Proteiinipitoisuuden optimointi pepsiinille: fluoresenssi adsorptiopuskurin pH:n funktiona.

7.8 Proteiinien isoelektrisen pisteen määrittäminen erilaisilla analysointimenetelmillä

Saaduista mittaustuloksista oli mahdollista analysoida proteiinin isoelektrinen piste kahdella eri tavalla; signaalista tai signaali/tausta-suhteesta. Seuraavaksi on esitetty tulokset kaikkien proteiinien isoelektrisen pisteen määrittämisestä kummallakin analysointitavalla.

7.8.1 Isoelektrisen pisteen määrittäminen fluoresenssisignaalista

Tässä tavassa pI määritetään suoraan fluoresenssisignaalista. Proteiinipitoisuudella 70 mg/l on signaali kaikilla proteiineilla todella suuri, ja pI :tä ei kyetä havaitsemaan käyrältä, koska proteiinia on niin paljon suurissakin pH:issa, ettei dissosiaatiopuskuri pääse protonoimaan koordinaatiosidosta, ja saadaan suuri signaali kaikissa pH:issa, kuten jo proteiinipitoisuutta optimoitaessa todettiin (otsikko 7.7). Pitoisuudella 0,21 mg/l on proteiinin isoelektrisen pisteen tulkitseminen käyrältä helpompaa. Teoriassa adsorptio on suurinta proteiinin pI :ssä ja adsorptio laskee pI :n kummallakin puolella matalalle johtuen proteiinien hylkimisestä sekä toisiaan että partikkeliä kohtaan ja proteiinien purkautumisesta. Tässä menetelmässä mitattiin kuitenkin partikkelin pinnan täyttöastetta. Partikkelin pinta täyttyy proteiinilla pI :tä matalammissa pH:issa ionisten vuorovaikutusten vuoksi. Proteiinit ovat voimakkaan positiivisesti varautuneita matalissa pH:issa ja adsorboituvat hyvin voimakkaan negatiivisesti narautuneeseen partikkeliin. Vaikka adsorboituvien proteiinien määrä on pienempi matalissa pH:issa, ne eivät ole (kovinkaan) stabiileja ja purkautuvat partikkelin pintaan saaden aikaan suuren pinnan täyttöasteen. Lähestyttäessä proteiinien pI :tä vähenevät ioniset vuorovaikutukset ja tärkeämpään rooliin tulee hydrofobiset vuorovaikutukset. Hydrofobisten vuorovaikutusten ansiosta adsorptiota tapahtuu hyvin pH:n noustessa pI :n yli. Hydrofobisten voimien vähentyessä adsorptio laskee, koska proteiinin varaus muuttuu yhä negatiivisemmaksi, mitä enemmän pH nousee pI :stä ylöspäin. Negatiivisesti varautunut proteiini ja negatiivisesti varautunut partikkeli hylkivät toisiaan. Adsorptio laskee pian proteiinien pI :n jälkeen tasaisen matalalle, joka

näkyä signaalin vähäisyytenä. Tässäkin on kuitenkin proteiinikohtaisia eroja, sillä molekyylipaino, koko ja stabiilisuus vaikuttavat kaikki niihin ominaisuuksiin proteiinissa, jotka taas vaikuttavat proteiinin adsorboitumiseen. Tässä menetelmässä pI :n on tulkittu olevan kyseisellä alueella, kun proteiinin adsorptio laskee tasaisen matalalle. Alue ei ole täysin yksiselitteinen ja joidenkin proteiinien kohdalla vaikeasti tulkittavissa. Kuvaajilta pI -alue on tulkittavissa ”parhaimmillaan” noin puolen pH -yksikön tarkkuudella, eli tässäkin on suurta vaihtelua eri proteiinien kohdalla. Taulukosta 4 nähdään tällä menetelmällä saadut isoelektriset pisteet kullekin proteiinille.

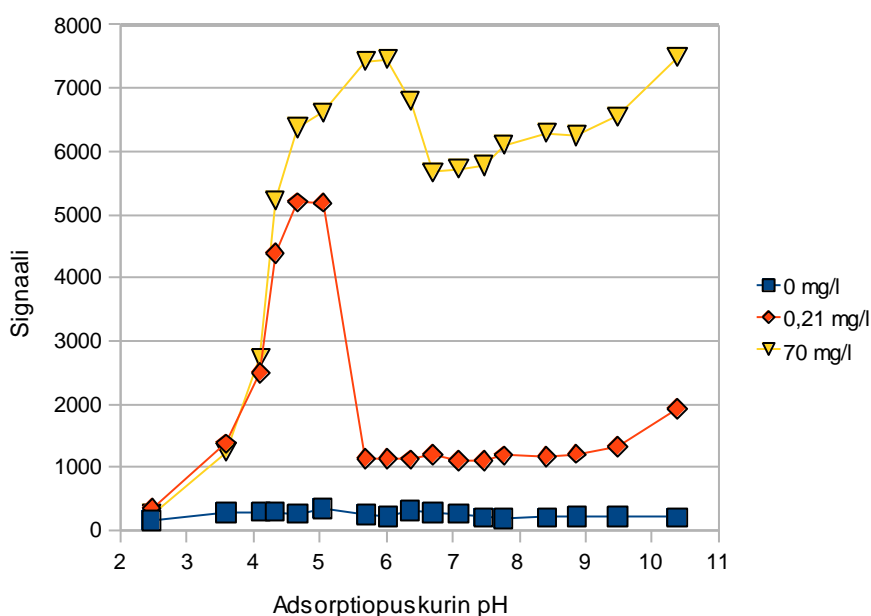
Taulukko 5. Proteiinien isoelektriset pisteet tulkittuna suoraan fluoresenssisignaalista.

Kuvio	Proteiini	Isoelektrinen piste
24	Naudan seerumin albumiini	5,5-6,0
25	Pepsiini	alle 2,5
26	Gammaglobuliini	7,5-8,0
27	Karboanhydraasi	6,5-7,0
28	Trypsinogeeni	8,0-8,5
29	Histoni	8,5- yli 10,5

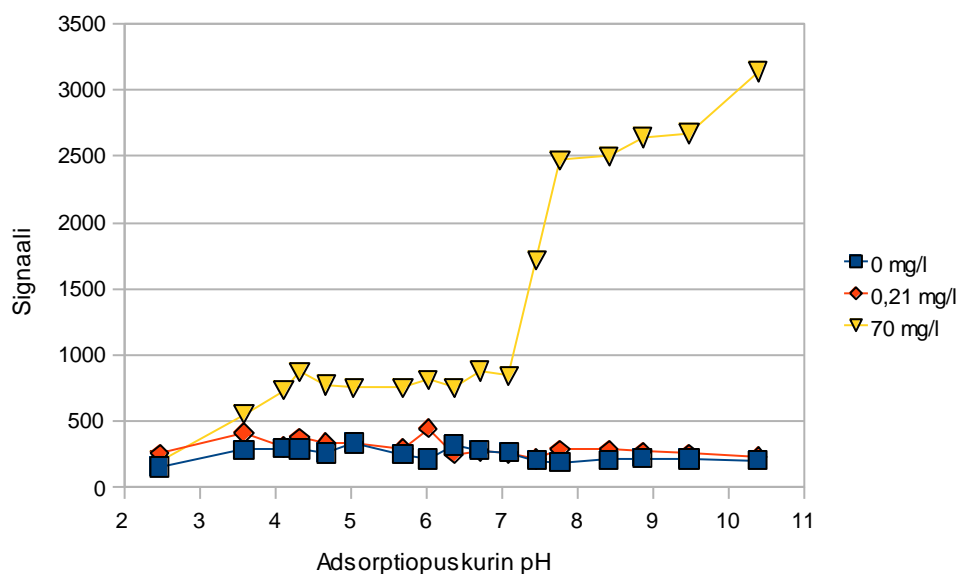
BSA:lle pI on helposti tulkittavissa kuvaajalta, koska signaali laskee jyrkästi tasaisen matalalle, eli pI :n on oltava siinä kohdassa, jossa adsorption määrä on laskenut jyrkästi ionisen hylkimisen vuoksi. BSA on suurikokoinen proteiini, jolle hydrofobisen vuorovaikutuksen luominen on helpompaa sen epästabiilin rakenteen vuoksi. Tästä johtuen adsorptio laskee voimakkaasti ionisen hylkimisen syrjäyttäessä hydrofobiset voimat. Vaikka γG :kin on BSA:n kaltainen suuri molekyyli, ei sen pI :n tulkitseminen kuvaajalta ole enää niin helppoa. Tämä voi johtua siitä, että γG on aina proteiinien seos ja jokainen erilainen

seoksen proteiini adsorboituu hieman eri tavalla. Tällöin ei voida saada selkeää signaalin laskua näkyviin.

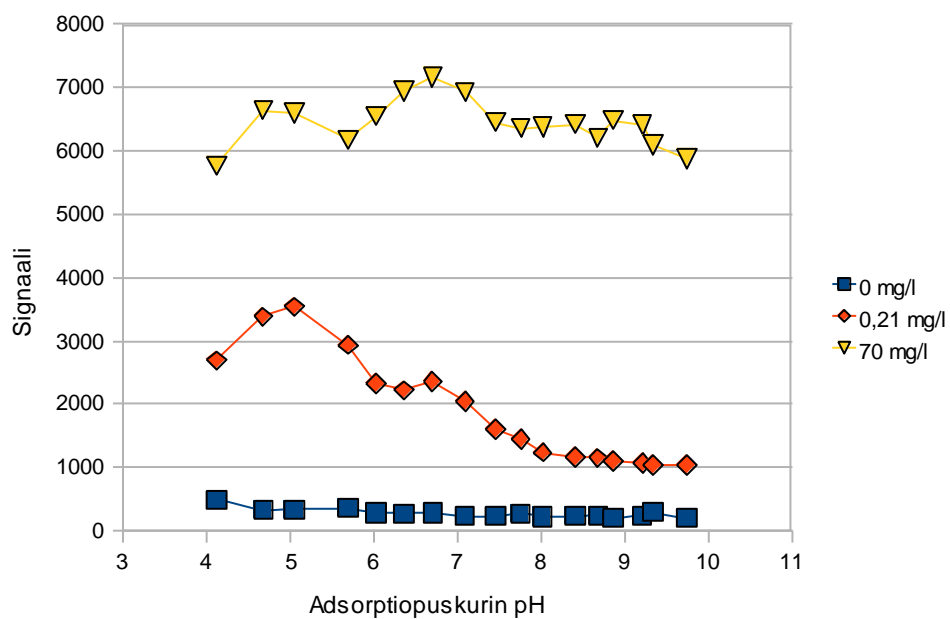
Pienemmillä, stabiileilla proteiineilla adsorptio perustuu enemmän koko pH-skaalalla ionisiin vuorovaikutuksiin, koska hydrofobiset vuorovaikutukset jäävät vähemmälle stabiilin rakenteen vuoksi. Pepsinin pI on myöskin helposti katsottavissa pitoisuudesta 0,21 mg/l, ja koska signaali ei missään kohta ole korkealla, voidaan sen ajatella olevan ennen ensimmäistä mittaus-pH:ta eli alle 2,5. Karboanhydraasin kohdalla signaali laskee selkeästi, tosin ei niin jyrkästi kuin BSA:n kohdalla. Trypsinogeenissäkin signaali laskee alas, mutta ei myöskään niin selkeästi kuin BSA:lla. Histonilla pI :n tulkinta on vaikeampaa, koska signaali tekee pienen notkahduksen pH:ssa 8,5-9,5 ja nousee tämän jälkeen taas hieman. Kirjallisuusarvoihin vertailtaessa voidaan olettaa, että notkahdus johtuu pipetointieroista.



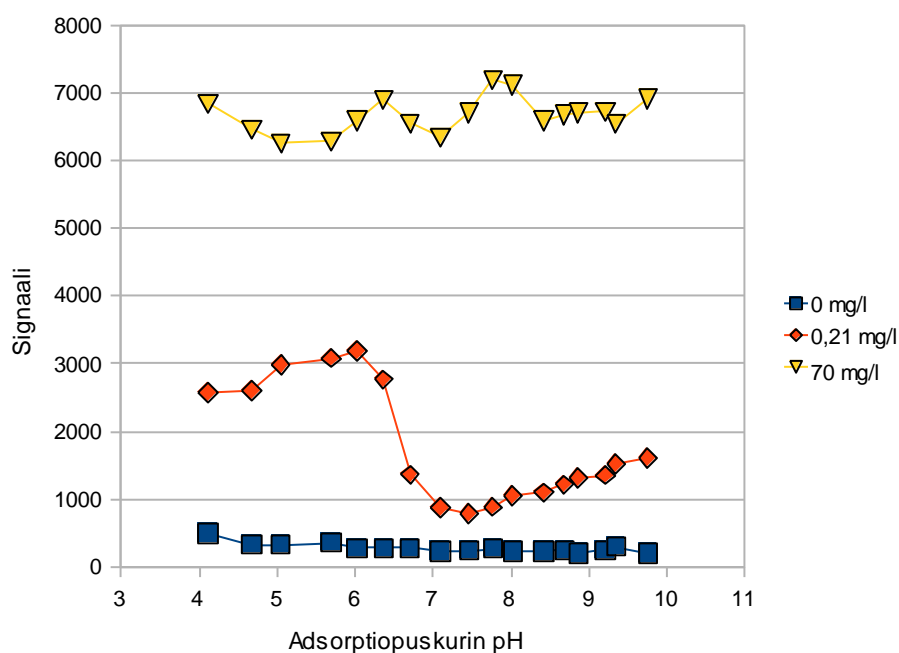
Kuvio 23. Naudan seerumin albumiinin (BSA) isoelektrisen pisteen määrittäminen fluoresenssisignaalista: fluoresenssisignaali adsorptiopuskurin pH:n funktiona.



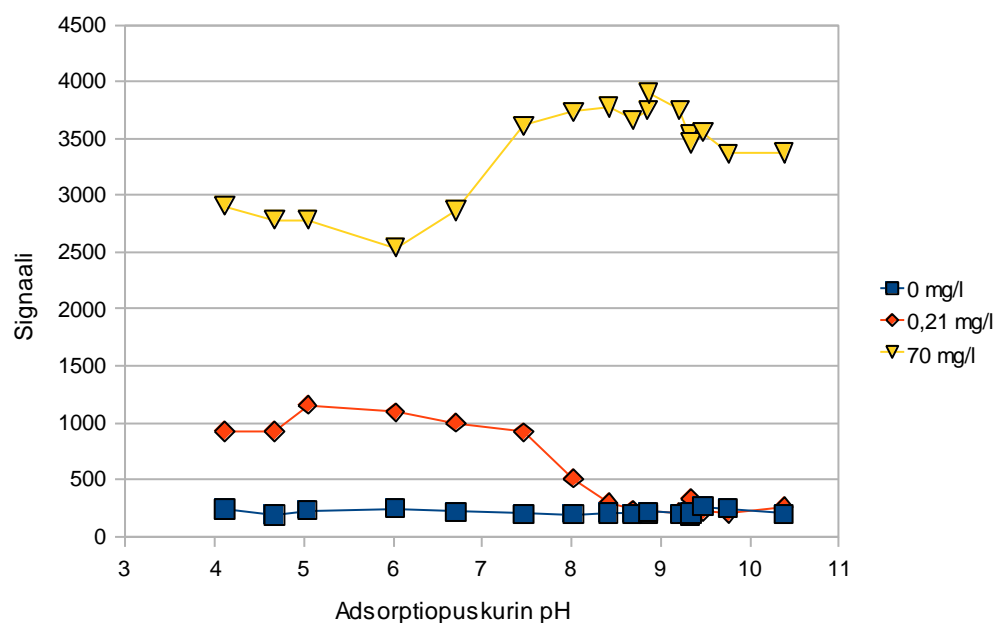
Kuvio 24. Pepsinin isoelektrisen pisteen määrittäminen fluoresenssisignaalista: fluoresenssisignaali adsorptiopuskurin pH:n funktiona.



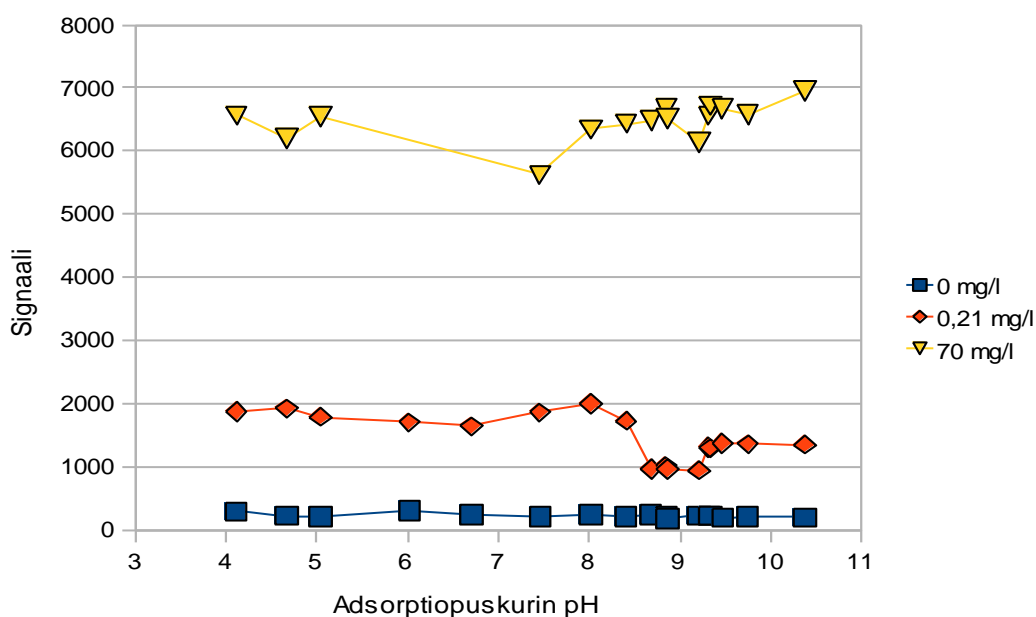
Kuvio 25. Gammaglobuliinin isoelektrisen pisteen määrittäminen fluoresenssisignaalista: fluoresenssisignaali adsorptiopuskurin pH:n funktiona.



Kuvio 26. Karboanhydraasin isoelektrisen pisteen määrittäminen fluoresenssisignaalista: fluoresenssisignaali adsorptiopuskurin pH:n funktiona.



Kuvio 27. Trypsinogeenin isoelektrisen pisteen määrittäminen fluoresenssisignaalista: fluoresenssisignaali adsorptiopuskurin pH:n funktiona.



Kuvio 28. Histonin isoelektrisen pisteen määrittäminen fluoresenssisignaalista: fluoresenssisignaali adsorptiopuskurin pH:n funktiona.

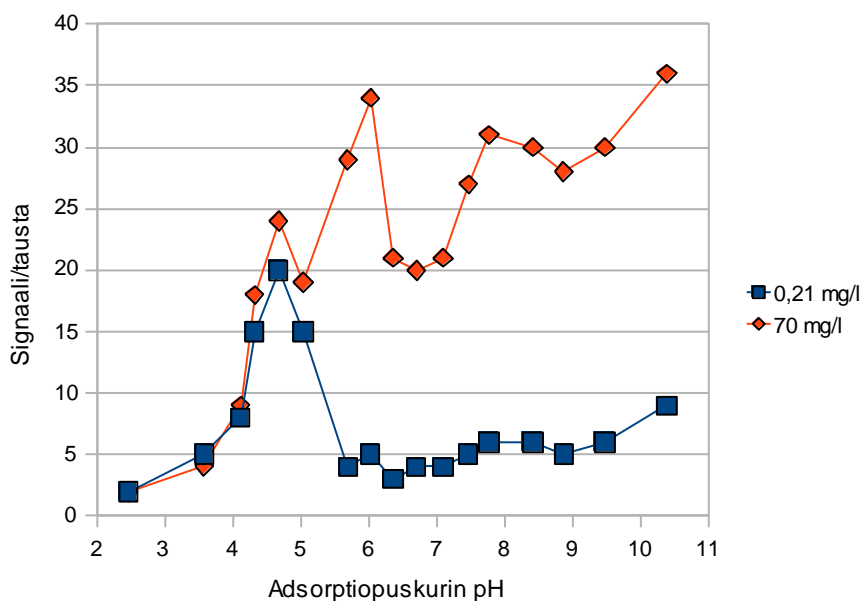
7.8.2 Isoelektrisen pisteen määrittäminen signaali/tausta-suhteesta

Tässä menetelmässä proteiinien isoelektrinen piste tulkitaan signaalin ja taustan suhteesta. Tässäkin on proteiinipitoisuus 70 mg/l liian suuri, jolloin proteiinien pI :tä ei kyetä havaitsemaan. Pitoisuudella 0,21 mg/l on isoelektrisen pisteen tulkitseminen selkeää. Tässäkin tapauksessa on proteiinin pI tulkittu kuvaajilta niin, että se on pH, jossa signaali/tausta-suhde tasoittuu matalalle, koska positiivisesti varautunut proteiini muuttuu vähitellen negatiivisesti varautuneeksi ja negatiivinen proteiini ei kykene adsorboitumaan negatiivisesti varautuneeseen partikkeliin, jolloin signaali laskee tasaisen matalalle. Myös tässä menetelmässä vaikuttavat samat asiat kuin aiemmassakin, vaikka tausta on otettu huomioon. Tällä menetelmällä saadut proteiinien isoelektriset pisteet on esitetty taulukossa 5.

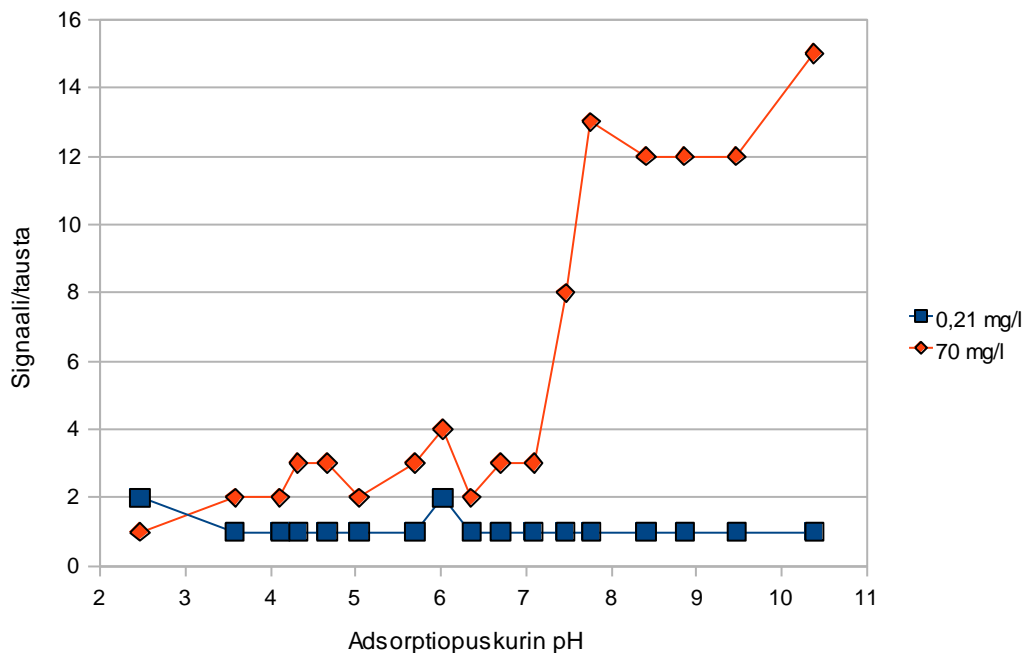
Taulukko 6. Proteiinien isoelektriset pisteet tulkittuna signaali/tausta –suhteesta.

Kuvio	Proteiini	Isoelektrinen piste
30	Naudan seerumin albumiini	5,5-6,0
31	Pepsiini	alle 2,5
32	Gammaglobuliini	7,5-8,0
33	Karboanhydraasi	6,5-7,0
34	Trypsinogeeni	8,0-8,5
35	Histoni	8,5-yli 10,5

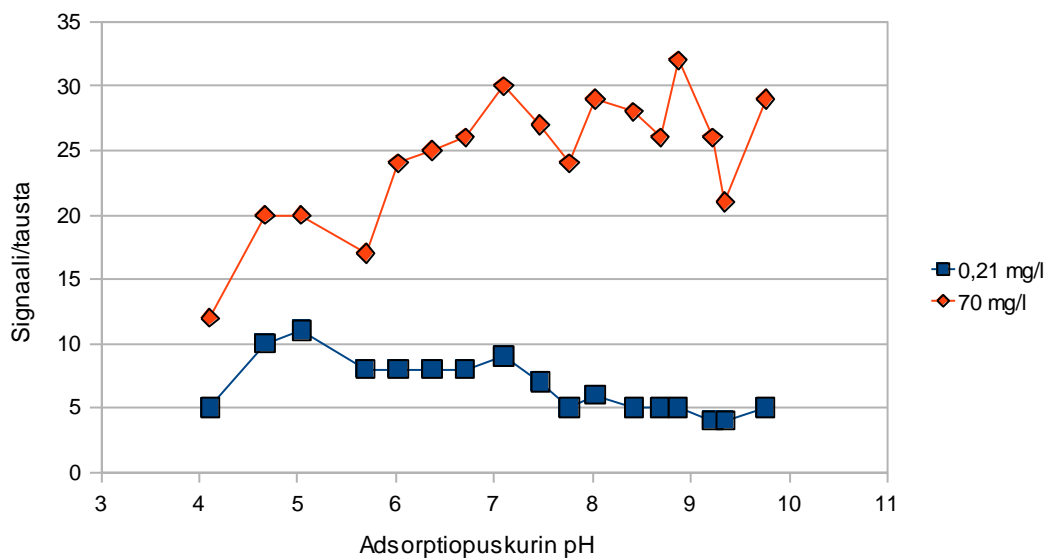
Tällä menetelmällä katsottuna signaali heittelee BSA:n signaalin laskun jälkeen enemmän kuin aiemmalla, vaikka signaalin lasku onkin helposti havaittavissa. Edelleenkin γ G:n signaalin lasku ei ole niin selkeästi havaittavissa, kuin BSA:n, vaikka tausta on otettu huomioon. Pepsiinin tulos näyttää täysin samalta, kuin pelkästä signaalistakin tulkittu. Myös karboanhydraasin kohdalla käy samoin kuin aiemminkin. Trypsinogeenin pl:n tulkinta on selkeää, koska vaikka signaali ei laskekaan jyrkästi, on se laskun jälkeen tasaisen matala. Histonilla on havaittavissa sama ongelma, kuin toisessakin menetelmässä, eli signaali laskee hetkellisesti alemmas, mutta nousee taas sieltä ylemmäs. Tämä heittely voi johtua siitä, että histoni on aina proteiinien seos ja seoksen proteiinien välillä on pieniä pl:n eroja. Myös pipetointivirheet voivat aiheuttaa tähän.



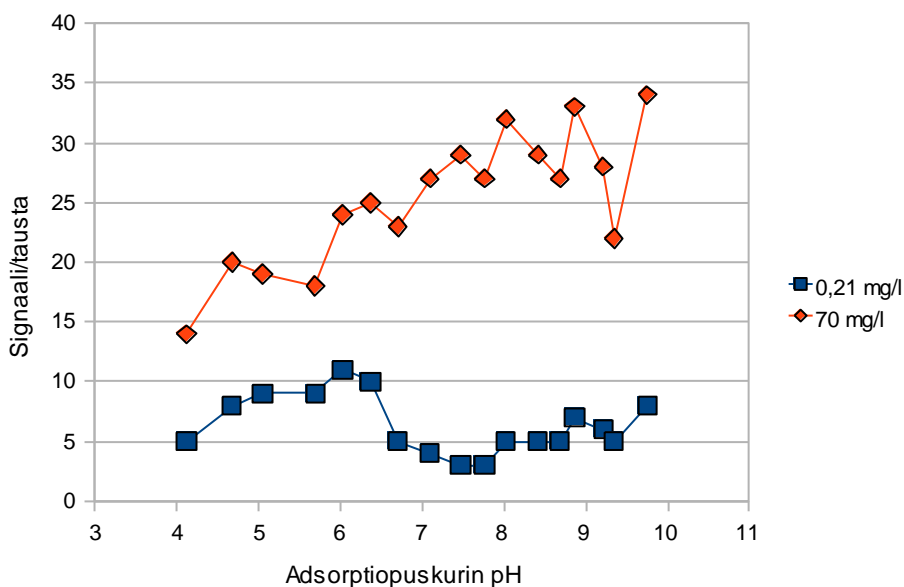
Kuvio 29. BSA:n isoelektrisen pisteen määrittäminen signaali/tausta-suhteesta: signaali/tausta-suhde adsorptiopuskurin pH:n funktiona.



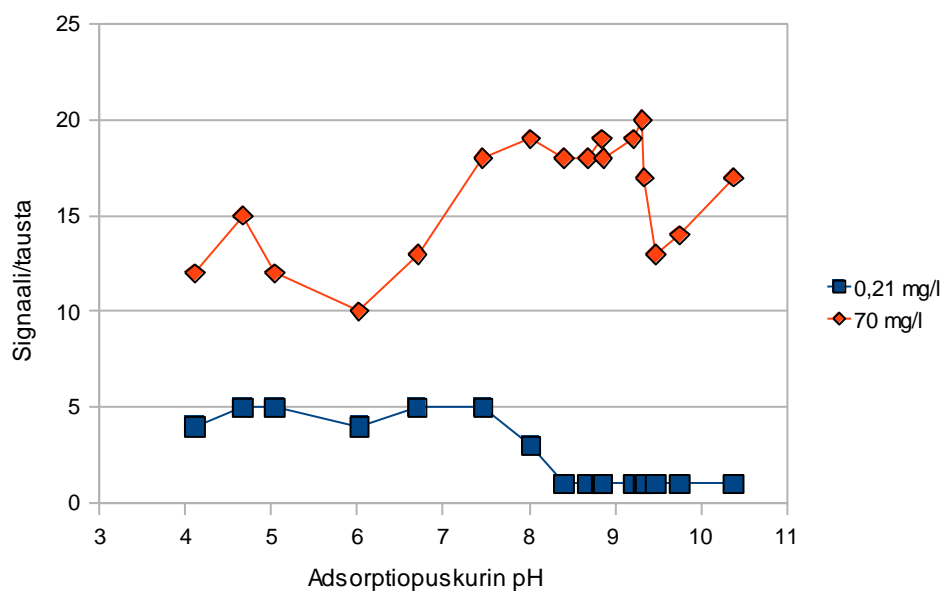
Kuvio 30. Pepsinin isoelektrisen pisteen määrittäminen signaali/tausta-suhteesta: signaali/tausta-suhde adsorptiopuskurin pH:n funktiona.



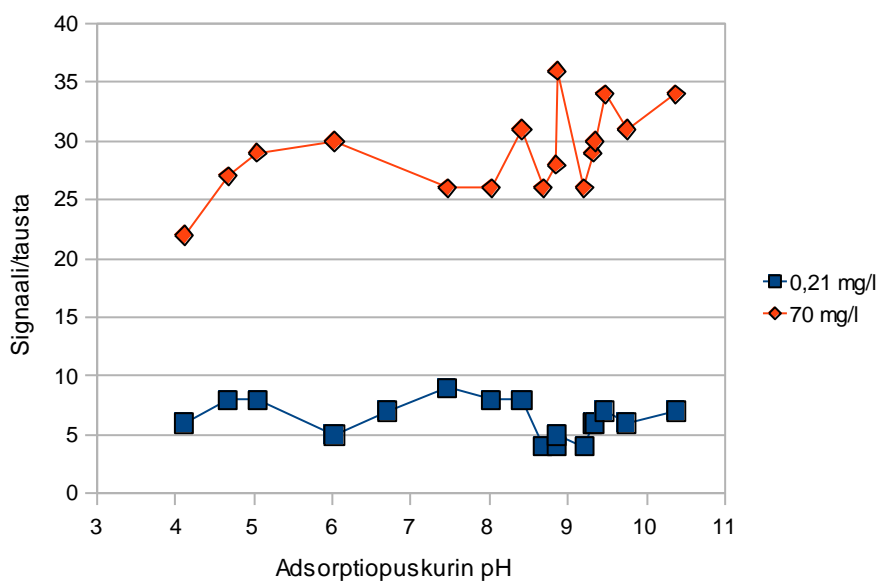
Kuvio 31. Gammaglobuliinin isoelektrisen pisteen määrittäminen signaali/tausta-suhteesta: signaali/tausta-suhde adsorptiopuskurin pH:n funktiona.



Kuvio 32. Karboanhydraasin isoelektrisen pisteen määrittäminen signaali/tausta-suhteesta: signaali/tausta-suhde adsorptiopuskurin pH:n funktiona.



Kuvio 33. Trypsinogeenin isoelektrisen pisteen määrittäminen signaali/tausta-suhteesta: signaali/tausta-suhde adsorptiopuskurin pH:n funktiona.



Kuvio 34. Histonin isoelektrisen pisteen määrittäminen signaali/tausta-suhteesta: signaali/tausta-suhde adsorptiopuskurin pH:n funktiona.

7.8.3 Tapojen vertailu

Taulukossa 6 on vertailtu kahta eri tapaa tulkita proteiinin isoelektrinen piste fluoresenssisignaalista kirjallisuuden arvoihin. Taulukosta nähdään, että kummallakin tavalla saadut tulokset ovat identtisiä keskenään, mutta arvot eivät täysin aina kohtaa kirjallisuusarvoa. Tämä johtuu monestakin syystä. Ensinnäkin, tällä menetelmällä ei vielä saavuteta yhtä tarkkaa arvoa proteiinin pI :lle, kuten kirjallisuusarvoissa yleensä on. Toiseksi, käytetty proteiini ei välttämättä kohtaa kirjallisuuden arvon proteiinin ominaisuuksia, sillä kyseessä voi olla hieman erilainen proteiini/proteiiniseos. Tämä menetelmä on hyvin riippuvainen juuri kyseisen proteiinin ominaisuuksista, kuten koosta, molekyylipainosta ja stabiilisuudesta, jotka kaikki vaikuttavat proteiinin adsorptioon nanopartikkelin pinnalle. Aina ei voida tietää, millä tavoin kirjallisuuden arvo on määritetty ja millaisella proteiinilla, jolloin ei voida tietää, ovatko nämä proteiinin ominaisuudet vaikuttaneet kirjallisuuden arvoon.

Kumpikaan menetelmä ei ole toista parempi tulkinnallisesti, mutta suorituksessa on eroja. Signaalista määritetty tapa ei vaatisi lainkaan taustan vaatimaa pipetointia, jolloin kuoppalevyjä ja aikaa kuluisi vähemmän. Signaalista suoraan määrittäminen on tavoista siis edullisempi ja nopeampi. Signaalista määritetyssä tavassa tuloksen myös näkee heti signaalin määrästä, kun taas signaali/tausta-suhteesta määrittäminen vaatii laskutoimituksia. Toisaalta signaali/tausta-suhde-menetelmässä saadaan poistettua tuloksista taustasäteily.

Taulukko 7. Eri menetelmin tulkittujen proteiinien isoelektrisen pisteen vertailu kirjallisuus arvoihin.

Proteiini	pI signaalista	pI signaali/tausta- suhteesta	pI:n kirjallisuusarvo
Naudan seerumin albumiini	5,5-6,0	5,5-6,0	4,7
Pepsiini	alle 2,5	alle 2,5	2,2
Gammaglobuliini	7,5-8,0	7,5-8,0	6,4 - 8,8
Karboanhydraasi	6,5-7,0	6,5-7,0	5,85
Trypsinogeeni	8,0-8,5	8,0-8,5	9,30
Histoni	8,5- yli 10,5	8,5-yli 10,5	11 - 12

7.9 Proteiinien teoreettinen pI

NCBI:llä haetut aminohapposekvenssit antoivat ExPaSyllä proteiinien pI-arvoiksi taulukosta 7 nähtävät arvot. γ G:lle ei saatu laskettua pI:tä, koska γ G on vasta-aineproteiinien seos, ja sille ei löydy määritettyä aminohapposekvenssiä. γ G:n pI voidaan määrittää vain kokeellisesti mittaamalla. Histonin tulos on vain yhdenlaisen histoniproteiinin (H2a) pI, koska histonikin on proteiinien seos, jossa on erityyppisiä histoni-proteiineja.

Taulukko 8. Proteiineille teoreettisesti lasketut pI:t.

Proteiini	Teoreettisesti laskettu pI
Karboanhydraasi	6,41
Histoni	10,88
Naudan seerumin albumiini	5,82
Pepsiini	3,24
Trypsinogeeni	8,69
Gammaglobuliini	ei voida laskea

8 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Verrattaessa kehitteillä olevaa isoelektrisen pisteen määrittämenetelmää jo olemassa oleviin menetelmiin, on tämä menetelmä osoittautunut potentiaalisesti menetelmäksi aikaisempien menetelmien rinnalle. Tällä menetelmällä saadaan arvio käytössä olevan proteiinin/proteiiniseoksen pI:stä suhteellisen nopeasti, edullisesti ja käyttäjäystävällisesti.

Käytettäessä teoreettista, proteiinin aminohapposekvenssiin perustuvaa laskinta tai kirjallisuus arvoa, on oltava tarkkana siitä, että kyseinen arvo vastaisi käytössä olevaa proteiinia/proteiiniseosta. Valmistajat eivät välttämättä ole määrittänyt käytössä olevan proteiinin/proteiiniseoksen pI:tä tai aminohapposekvenssiä, jolloin ei koskaan voida olla täysin varmoja, että laskimella saatu arvo tai kirjallisuusarvo vastaisi käytössä olevan proteiinin pI:tä. Tämän vuoksi olisi luotettavampaa määrittää käytössä olevan proteiinin/proteiiniseoksen pI itse kokeellisesti. Taulukossa 8 on esitetty eroja eri tavalla määritettyjen isoelektristen pisteiden välillä.

Taulukko 9: Kirjallisen-, teoreettisen laskimen- ja määritetyn proteiinin isoelektrisen pisteen vertailu.

Proteiini	Kirjallisuuden antama arvo pI:lle	Teoreettisen pI:n laskimen antama arvo pI:lle	Menetelmän antama arvo pI:lle
Naudan seerumin albumiini	4,7	5,82	5,5-6,0
Pepsiini	2,2	3,24	alle 2,5
Gammaglobuliini	6,4 - 8,8	Ei voida laskea	7,5-8,0
Karboanhydraasi	5,85	6,41	6,5-7,0
Trypsinogeeni	9,30	8,69	8,0-8,5
Histoni	11 - 12	10,88	8,5- yli 10,5

Isoelektrinen fokusointi on yleisesti käytetty menetelmä proteiinien pI:n määrittämiseen kokeellisesti. Uusi menetelmä voisi olla tulevaisuudessa hyvä kokeellinen määrittämenetelmä isoelektrisen fokusoinnin rinnalle. Uusi menetelmä antaa arvion proteiinin/proteiiniseoksen pI:stä, joidenkin proteiinien kohdalla tarkemman kuin toisten. Uusi menetelmä vaatii vain vähän käytettävää proteiinia verrattuna isoelektriseen fokusointiin. Tässä menetelmässä osoitettiin proteiinia tarvittavan vain pitoisuudella 0,21 µg/ml. Isoelektrisessä fokusoinnissa pitoisuustarve on 30-2000 µg/ml. Uusi menetelmä on myös käyttäjäystävällinen, sillä se ei vaadi kalliita tai vaarallisia reagensseja. Uudella menetelmällä tarvittava työskentelyaika on lyhyt, sillä se ei vaatisi kuin proteiinin, nanopartikkelien ja dissosiaatiopuskurin lisäyksen, 20 minuutin odottelun ja muutamien minuuttien mittauksen riippuen näytteiden määrästä. Menetelmä vaatii vain yhden, todella helppokäyttöisen ja yleisen laitteen. Menetelmä ei vaadi kalliita laitteita tai määrittämiseen vaadittavia oheistuotteita, pelkkä aikaerotteista fluoresenssia mittaava laite ja kuivattu kuoppalevy riittävät.

Menetelmää kehitettäessä on mahdollisuus päästä tarkempiin pI-arvoihin, kuin mihin menetelmä nyt pystyy. Menetelmän kehitys vaatii vielä optimointeja lisää, mutta hyvään alkuun päästiin optimoimalla proteiinipitoisuus, dissosiaatiopuskuri ja sen pitoisuus, nanopartikkelien pitoisuus ja dissosiaatiopuskurin vaikuttamiseen tarvittava aika.

9 LÄHTEET

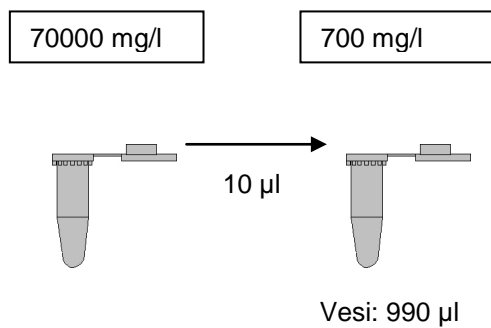
1. Lakowicz, J.R. 2006. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Kolmas painos. New York: Springer Science + Business Media.
2. Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. 5.-6. painos. Helsinki: Edita Prima Oy.
3. Hemmilä, I.; Ståhlberg, T. & Mottram, P. Bioanalytical Applications of Labelling Technologies. Turku: Wallac, EG & G company.
4. Selvin, P.R. 2002. Principles and Biophysical Applications of Lanthanide-based Probes (Annual Review). Biophysics and Biomolecular Structure, 31, 275-302.
5. Suominen, I. 2010. Jälkikäsittelytekniikat Teoria.
6. Lassen, B. 1995. Studies of Competitive Protein Adsorption. Göteborg: University of Gothenburg and Institute of Surface Chemistry.
7. Quiquampoix, H. 2000. Mechanisms of Protein Adsorption on Surfaces and Consequences for Extracellular Enzyme Activity in Soil. Soil Biochemistry, 10, 171-206.
8. Andrade, J.D. & Hlady, V. 1986. Protein Adsorption and Materials Biocompatibility. A Tutorial Review and Suggested Hypotheses. Advances in Polymer Science, 79, 1-63.
9. Stryer, L. 1988. Biochemistry. Kolmas painos. New York: W. H. Freeman & Company.
10. Höök, F. 1997. Development of a Novel QCM Technique for Protein Adsorption Studies (PhD Thesis). Göteborg: Chalmers University of Technology and Göteborg University.
11. Malmsten, M. (jne.). Biopolymers at Interfaces. Toinen painos Surfactant Science sarjasta, vuosikerta 110. New York: Marcel Dekker.
12. Israelachvili, J. & Pashley, R. 1982. The Hydrophobic Interaction is Long Range, Decaying Exponentially with Distance. Nature, 300, 341-342.
13. Rick, S.W. & Berne, B.J. 1997. Free Energy of the Hydrophobic Interaction from Molecular Dynamics Simulation: The Effects of Solute and Solvent Polarizability. The Journal of Physical Chemistry B, 101, 10488-10493.
14. Subramaniam, S., Donevan, S.D. & Rokawski M.A. 1994. Hydrophobic Interactions of *n*-Alkyl Diamines with the *N*-Methyl-*D*-aspartate Receptor: Voltage-Dependent and -Independent Blocking Sites. Molecular Pharmacology, 45, 117-124.
15. Norde, W., Tan, W. & Koopal, L. 2008. Protein Adsorption at Solid Surfaces and Protein Complexation with Humic Acids. Chile: Fifth International Symposium ISMOM 2008.
16. Nakanishi, K., Sakiyama, T. & Imamura, K. 2001. On the Adsorption of Proteins on Solid Surfaces, a Common but Very Complicated Phenomenon. Journal of Bioscience and Bioengineering, 91, 233-244.
17. Andrade, J.D. 1985. Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers. Vuosikerta 2: Protein Adsorption. New York: Plenum Press.
18. Jennissen, H.P. 1981. The Binding and Regulation of Biologically Active Proteins on Cellular Interfaces: Model Studies on Enzyme Adsorption on Hydrophobic Binding Site Lattices and Biomembranes. Advances in Enzyme Regulation, 19, 377-406.

19. Malvern Instruments. Zeta Potential An Introduction in 30 minutes. Zetasizer Nano Serles Technical Note. MRK654-01.
20. Brookhaven Instruments Corporation. What is Zeta Potential. Viitattu 8.4.2011. <http://www.bic.com> > Literature > Theory > What is Zeta Potential.
21. Solunetti 2006. Kaksiulotteinen PAGE. Viitattu 28.01.2011. <http://www.solunetti.fi> > tutkimus > Biokemiallisia menetelmiä > Elektroforeesi > Proteiinien SDS-PAGE.
22. GMI Inc 2011. Pharmacia PhastSystem High Speed Electrophoresis System. Viitattu 28.01.2011. <http://www.gmi-inc.com> > Biotech > Electrophoresis > Power Supply.
23. GE Healthcare. PhastSystem™. Viitattu 8.4.2011. http://www.gelifesciences.com/aprix/upp01077.nsf/content/life-sciences_homepage > Search > PhastSystem > PhastSystem Separation-Control and Development Units 120 VAC.
24. SIB Swiss Institute of Bioinformatics. ExPasy Proteomics Server. Viitattu 11.2.2011. <http://au.expasy.org> > Proteomics tools> ProParam.
25. National Center for Biotechnology Information. Welcome to NCBI. Viitattu 11.2.2011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> > Search > Protein
26. Radboud University Nijmegen. Multilabel Counter (Victor Wallac). Viitattu 28.01.2011. <http://www.ru.nl> > General Instruments > Facilities
27. Research Center for Drug Discovery; National Yang-Ming University. Wallac Victor 2 Multi-Label Counter. Viitattu 9.4.2011. <http://rcdd-e.web.ym.edu.tw/front/bin/ptlist.phtml?Category=12>
28. Wui. S.A. & Menachem. E. 2007. Protein (BSA) Fouling of Reverse Osmosis Membranes: Implications for Wastewater Reclamation. *Journal of Membrane Science*, 296, 83-92.
29. Righetti, P.G., Bossi, A., Görg, A., Obermaier, C. & Boguth, G. 1995. Steady-State Two-Dimensional Maps of Very Alkaline Proteins in an Immobilized pH 10-12 Gradient, as Exemplified by Histone Types. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 31, 81-91.
30. Sigma-Aldrich. Pepsin from Porcine Gastric Mucosa. Viitattu 9.4.2011. <http://www.sigmaaldrich.com> > Search > Pepsin > P 7000
31. Jones, R.G.A. & Landon, J. 2002. A Protocol for 'Enhanced Pepsin Digestion': A Step by Step Method for Obtaining Pure Antibody Fragments in High Yield from Serum. *Journal of Immunological Methods (Protocol)*, 275, 239-250.
32. Bergenhem, N.C.H., Hallberg, M. & Wisen, S. 1998. Molecular Characterization of the Human Carbonic Anhydrase-Related Protein (HCA-RP VIII). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1384, 294-298.
33. Righetti, P.G. 2003. Determination of the Isoelectric Point of Proteins by Capillary Isoelectric Focusing. *Journal of Chromatography, A*, 1037, 491-499.
34. Malpiedi, L.P., Pico', G. & Nerli, B. 2008. Features of Partitioning Pattern of Two Pancreatic Enzymatic Precursors: Trypsinogen and Chymotrypsinogen in Polyethyleneglycol–Sodium Citrate Aqueous Biphasic Systems. *Journal of Chromatography, B*, 870, 1-7.
35. Virta, A., Komu, M., Kormanen, M. & Lundbom, N. 1995. Magnetization Transfer in Protein Solutions at 0.1 T: Dependence on Concentration, Molecular Weight, and Structure. *Academic Radiology*, 2, 792-798.
36. Condie, R. M. 1981. Pure Intravenous Human and Animal Gamma Globulins. US Patent Number US4296027.

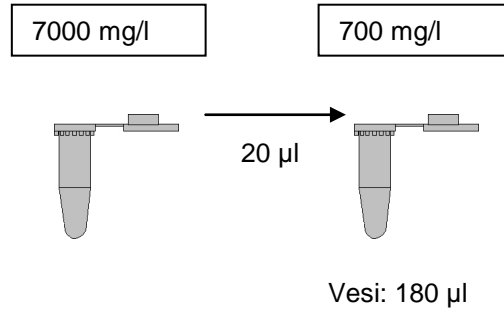
37. NCBI Protein Translations of Life. Bovine serum albumin [Bos Taurus]. Viitattu 14.2.2011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> > Search > Protein > Bovine serum albumin > Bovine serum albumin [Bos Taurus]
38. NCBI Protein Translations of Life. Chain A, Crystal Structure of Ascaris Pepsin inhibitor-3 Bound to Porcine Pepsin. Viitattu 14.2.2011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> > Search > Protein > Pepsin from porcine gastric mucosa > Chain A, Crystal Structure of Ascaris Pepsin inhibitor-3 Bound to Porcine Pepsin
39. NCBI Protein Translations of Life. Carbonic Anhydrase 2 [Bos Taurus]. Viitattu 11.2.2011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> > Search > Protein > carbonic anhydrase from bovine erythrocytes > Carbonic Anhydrase 2 [Bos Taurus]
40. NCBI Protein Translations of Life. Chain A, Bovine Pancreas Beta-Trypsin in Complex with Bensylamine. Viitattu 14.2.2011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> > Search > Protein > Trypsinogen from bovine pancreas > Chain A, Bovine Pancreas Beta-Trypsin in Complex with Bensylamine
41. NCBI Protein Translations of Life. RecName: Full=Histone H2A. Viitattu 11.2.2011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> > Search > Protein > histone from calf thymus type 2 > RecName: Full=Histone H2A
42. Onnettomuuden vaaraa aiheuttavat aineet: Kloorivety ja suolahappo. OVA-ohje: kloorivety ja suolahappo. Viitattu 23.3.2011. <http://www.ttl.fi> > Aihealueet > Kemikaaliturvallisuus > OVA-ohjeet, Kemikaalikortit, Kamat-kortit > OVA-ohjeet > Kloorivety ja suolahappo
43. Sigma-Aldrich. Histone from Calf Thymus. Product Information.

Proteiinilaimennosten valmistus mittauksiin 1

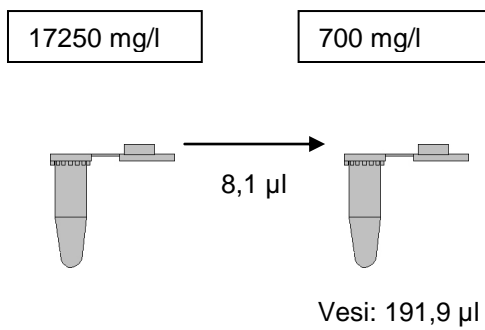
BSA



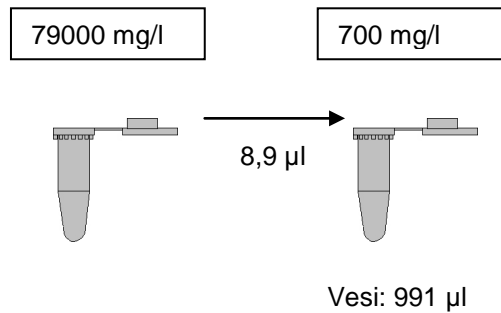
Histoni



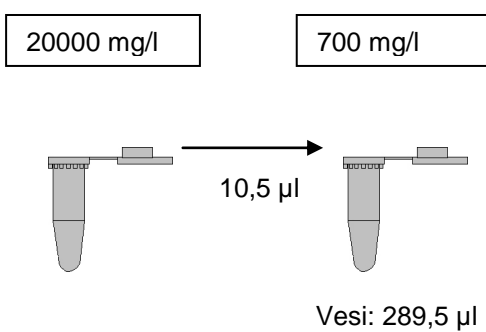
Pepsiini



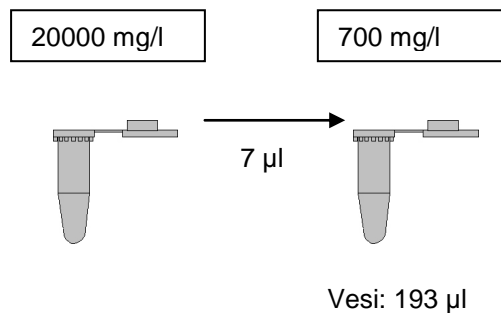
γG



Trypsinogeen

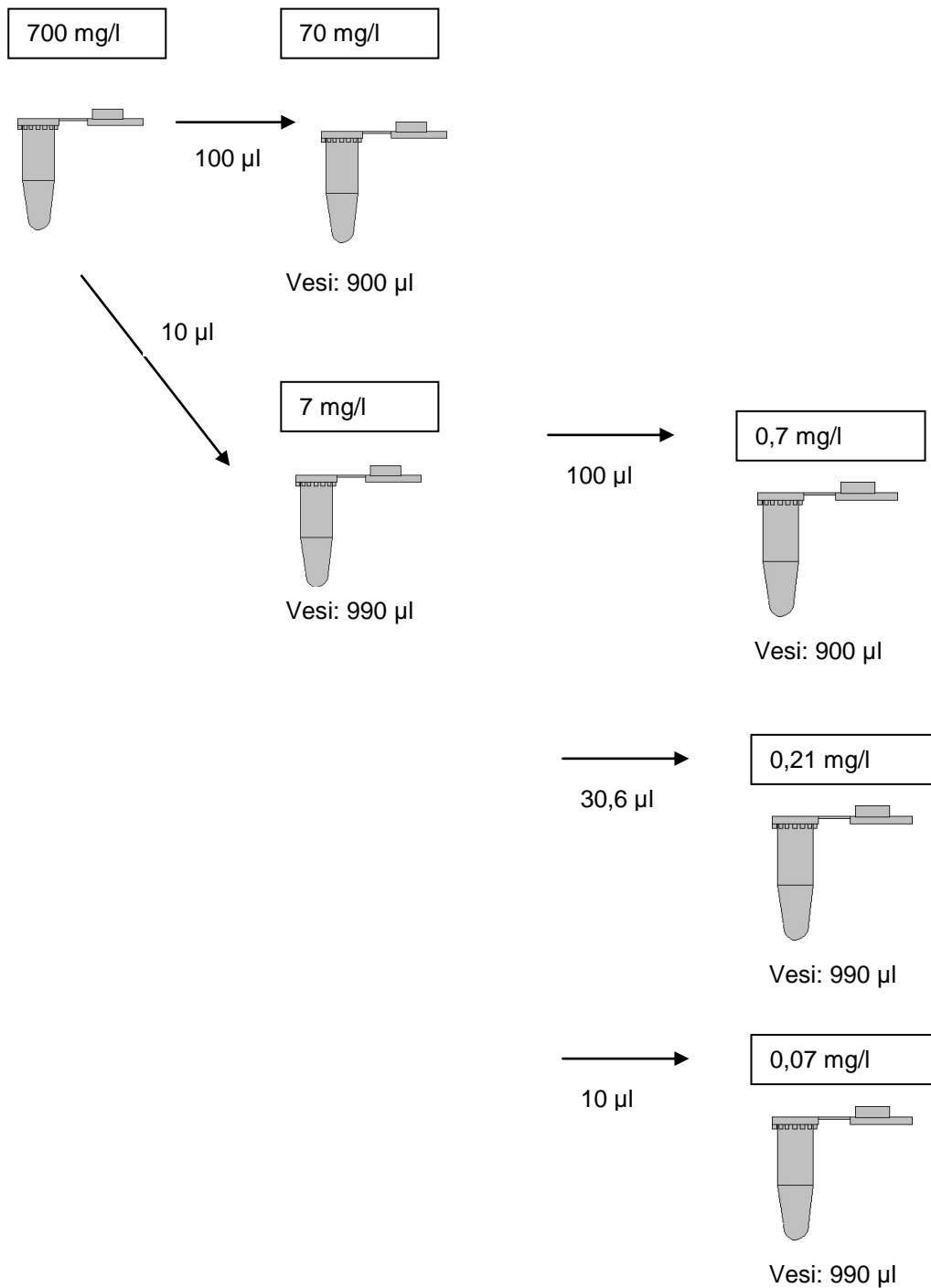


CA



Kuvio 35. Proteiinilaimennosten 700 mg/l valmistus.

Proteiinilaimennosten valmistus mittauksiin 2



Kuvio 36. Loppujen proteiinipitoisuuksien valmistus mittauksiin.